

---

# **Die Rolle von DNMT1 bei der postmitotischen Entwicklung von inhibitorischen kortikalen Interneuronen**

---

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von M. Sc. Judit Symmank  
geboren am 06.06.1987 in Hoyerswerda

Gutachter:

1. Prof. Dr. Geraldine Zimmer-Bensch, Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. Aria Baniahmad, Universitätsklinikum Jena
3. Prof. Dr. Marco Rust, Philipps-Universität Marburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 22.05.2018

## Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrokarbonat
CGE	caudale ganglionische Eminenz
DIV	„days <i>in vitro</i> “ - Tage <i>in vitro</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphate
E1-20	Embryonaltag 1-20 (E0 = Tag der Befruchtung)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	fötales Kälberserum
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GBSS	Gey's balanced salt solution
GE	ganglionischen Eminenz
GO	Genontologie
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEPES	N- (2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2- Ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
ISH	<i>In situ</i> Hybridisierung
IMZ	Intermediärzone
kb	Kilobasen
KP	kortikale Platte
Ktx	Kortex
KO	Knockout
LB	Luria Broth
LGE	laterale ganglionische Eminenz
MGE	mediale ganglionische Eminenz
mRNA	„messenger“ Boten-RNA
MZ	Marginalzone
n	Stichprobenumfang
n.s.	nicht signifikant
NBT	Nitroblue Tetrazolium Chlorid
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
POA	präoptisches Areal
qPCR	quantitative „real time“ PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
SMS	superfizieller migratorischer Strom
SP	Subplatte
Str	striatale Anlage/Striatum
Strep	Streptavidin
SVZ	Subventrikularzone
Tab	Tabelle
TMS	tiefer migratorischer Strom
tRNA	Transfer-RNA
VZ	Ventrikularzone
WT	Wildtyp

Abkürzungsverzeichnis.....	I
<b>1. Zusammenfassung/Summary .....</b>	<b>1</b>
1.1. Zusammenfassung .....	1
1.2. Summary.....	3
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>5</b>
2.1. Entwicklungsrelevante Prozesse kortikaler Interneurone .....	6
2.2. Intrinsische und extrinsische Determinierung kortikaler Interneurone .....	6
2.3. Die tangentiale und radiale Migration kortikaler Interneurone .....	9
2.4. Die Morphologie von tangential migrierenden Interneuronen.....	13
2.5. Das Überleben von Interneuronen während der Migration und Reifung .....	14
2.6. LIM-Homeobox-Transkriptionsfaktoren in der Entwicklung von Interneuronen.....	15
2.7. DNA-Methylierung und die Vernetzung mit Histonmodifikationen.....	17
<b>3. Zielstellung .....</b>	<b>21</b>
3.1. Charakterisierung des Einflusses von DNMT1 auf die postmitotische Entwicklung von POA-abstammenden Interneuronen .....	21
3.2. Analyse der Rolle von LHX1 in der Migration und der Regulation des Überlebens unreifer Interneurone.....	22
<b>4. Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1. Verwendete Organismen .....</b>	<b>23</b>
4.1.1. Versuchstiere, Haltung und Verpaarung .....	23
4.1.2. Wirtsbakterien.....	24
4.1.3. Zellkulturlinien.....	24
<b>4.2. Zellbiologische Mechanismen .....</b>	<b>24</b>
4.2.1. Steriles und RNase-freies Arbeiten.....	24
4.2.2. Organentnahme und Präparation von Gehirngewebe .....	25
4.2.3. Herstellung von Gehirnschnitten und Free-Floating Schnitten.....	25
4.2.4. Anfertigung organotypischer Hirnschnitte .....	26
4.2.5. Zeitrafferaufnahmen an organotypischen Hirnschnitten .....	26
4.2.6. Präparation von dissoziierten Einzelzellen.....	26
4.2.7. siRNA- und Plasmid-Transfektion .....	27
4.2.8. Kultivierung mit dem DNMT-Inhibitor RG108.....	28

4.2.9.	<i>FACS-Anreicherung von tdTomato-positiven Zellen</i> .....	28
<b>4.3.</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>28</b>
4.3.1.	<i>Isolation von RNA und DNA</i> .....	28
4.3.2.	<i>Immunopräzipitation methylierter DNA (MeDIP)</i> .....	29
4.3.3.	<i>Next Generation Sequencing</i> .....	29
4.3.4.	<i>Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)</i> .....	30
4.3.5.	<i>Amplifikation und Analysen durch Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)</i> .....	31
4.3.5.1.	<i>Genotypisierung und Standard-PCR</i> .....	32
4.3.5.2.	<i>Expressionsanalysen und siRNA-Validierung mittels quantitativer PCR</i> .....	33
4.3.5.3.	<i>Voramplifikation und qPCR von ChIP-DNA-Proben</i> .....	35
4.3.6.	<i>In situ Hybridisierung zur Detektion von mRNA</i> .....	37
4.3.7.	<i>Immunfluoreszenzmarkierung an adulten Gehirnschnitten und kultivierten Einzelzellen</i> .....	38
4.3.8.	<i>TUNEL-Apoptose Assay</i> .....	39
<b>4.4.</b>	<b>Mikroskopie, Datenauswertung und Statistik</b> .....	<b>39</b>
4.4.1.	<i>Quantifizierung von Zellmorphologie und -migration</i> .....	40
4.4.1.1.	<i>Analyse der Zellmorphologie in Gehirnschnitten und von Einzelzellen</i> .....	40
4.4.1.2.	<i>Analysen der Zellzahl und -lokalisation in Gehirnschnitten</i> .....	40
4.4.1.3.	<i>Analyse von Migrationsweiten und -wegen in Gehirnschnitten</i> .....	41
4.4.1.4.	<i>Analyse von Fluoreszenzintensitätsaufnahmen</i> .....	42
4.4.2.	<i>Statistik</i> .....	43
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>44</b>
<b>5.1.</b>	<b>Die DNA-Methyltransferase 1 reguliert die Expression relevanter Gene in der Entwicklung von POA-abstammenden Interneuronen</b> .....	<b>45</b>
5.1.1.	<i>DNMT1 beeinflusst die tangentielle Migration POA-abstammender kortikaler Interneurone</i> .....	45
5.1.2.	<i>DNMT1 reguliert die Morphologie und das Überleben migrierender POA-abstammender Interneurone</i> .....	47
5.1.3.	<i>Die Expression von Pak6 wird durch DNMT1 reguliert</i> .....	51
5.1.4.	<i>Die Proteinkinase PAK6 besitzt sowohl Zellmorphologie- als auch Zelltod-regulierende Funktionen</i> .....	52

5.1.5.	<i>Die erhöhte Komplexität Dnmt1-defizienter POA-Zellen kann durch induzierte Pak6 Reduktion deutlich vermindert werden</i> .....	54
5.1.6.	<i>Die Pak6 Expression scheint nicht durch direkte DNA-Methylierung des Pak6 Genlocus reguliert zu werden</i> .....	56
5.1.7.	<i>DNMT1-abhängige Veränderungen spezifischer Histonmodifikationen scheinen die Genexpression von Pak6 zu steuern</i> .....	57
<b>5.2.</b>	<b>Der durch DNMT1-regulierte Transkriptionsfaktor LHX1 ist an der Entwicklung kortikaler Interneurone beteiligt</b> .....	<b>61</b>
5.2.1.	<i>Die Expression von Lhx1 überlappt in Regionen des POA mit dem postmitotisch exprimierten Transkriptionsfaktor HMX3</i> .....	61
5.2.2.	<i>DNMT1 reguliert die Expression von Lhx1 scheinbar unabhängig von direkter DNA-Methylierung seines Genlocus</i> .....	62
5.2.3.	<i>LHX1 beeinflusst das Überleben von neuronalen Zellen aus dem POA</i> .....	64
5.2.3.1.	<i>Die postmitotische Deletion von Lhx1 führt zu einer gesteigerten Anzahl POA-abstammender Interneurone</i> .....	65
5.2.3.2.	<i>LHX1 scheint in der Expressionskontrolle von Apoptose-assoziierten Genen involviert zu sein</i> .....	67
5.2.3.3.	<i>Die Deletion von Lhx1 führt zu einer erhöhten Anzahl an Neuronen im adulten Gehirn</i> .....	68
5.2.4.	<i>LHX1 beeinflusst die Kortex-gerichtete tangentielle Migration POA-abstammender Zellen</i> .....	71
5.2.4.1.	<i>Die Deletion von Lhx1 führt zu einer teilweisen Fehlpositionierung von POA-abstammenden Zellen im adulten Kortex</i> .....	71
5.2.4.2.	<i>Die Lenkung migrierender POA-abstammender Neurone wird durch LHX1 reguliert</i> 72	
5.2.4.3.	<i>LHX1 bedingt die Expression spezifischer Lenkungsfaktoren</i> .....	74
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>78</b>
<b>6.1.</b>	<b>DNMT1 reprimiert Reife- und Zelltod-assoziierte Gene in migrierenden Interneuronen aus dem präoptischen Areal</b> .....	<b>79</b>
<b>6.2.</b>	<b>Das Überleben unreifer Interneurone wird durch DNMT1 gesichert</b> .....	<b>80</b>
<b>6.3.</b>	<b>DNMT1 reguliert die Expression Zelltod-assoziiierter Proteinkinasen</b> .....	<b>82</b>
<b>6.4.</b>	<b>Der Transkriptionsfaktor LHX1 begrenzt das Überleben von POA-abstammenden Zellen</b> .....	<b>84</b>

6.5.	<b>DNMT1 sichert die adäquate Migration unreifer Interneurone in den zerebralen Kortex .....</b>	<b>87</b>
6.6.	<b>Eine verfrühte Komplexitätszunahme wird durch DNMT1 in migrierenden Interneuronen unterbunden .....</b>	<b>89</b>
6.7.	<b>Die Lenkung von tangential migrierenden POA-Interneuronen wird durch LHX1 beeinflusst .....</b>	<b>90</b>
6.8.	<b>Die Vernetzung verschiedener epigenetischer Mechanismen reguliert die differente Genexpression .....</b>	<b>93</b>
6.9.	<b>Schlussfolgerungen und Ausblick .....</b>	<b>95</b>
7.	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>II</b>
8.	<b>Anhang .....</b>	<b>XXXVII</b>
8.1.	<b>Zusatzmaterial: Tabelle 10 .....</b>	<b>XXXVII</b>
8.2.	<b>Zusatzmaterial: Zeitrafferaufnahmen .....</b>	<b>XXXVII</b>
8.3.	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>XXXVIII</b>
8.4.	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XXXIX</b>
8.5.	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>XL</b>
8.6.	<b>Publikationen und Posterpräsentationen .....</b>	<b>XLI</b>
8.7.	<b>Danksagung .....</b>	<b>XLII</b>

# 1. Zusammenfassung/Summary

## 1.1. Zusammenfassung

Die korrekte Balance zwischen Exzitation und Inhibition ist grundlegend wichtig für die Funktionalität des Neokortex. Kortikale GABAerge Interneurone modulieren dabei die Signalweiterleitung und Defekte in ihrer Entwicklung sind mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert. Daher ist die Aufklärung relevanter Faktoren, welche die für sie charakteristische ausgedehnte postmitotische Differenzierungs- und Reifungsphase regulieren, von großem Interesse. Neben der Subtyp-spezifischen Migration in kortikale Zielareale umfasst diese Phase auch die Ausbildung distinkter zellulärer Merkmale. Eine streng regulierte, aber auch flexible Kontrolle der Genexpression ist hierbei von entscheidender Bedeutung.

Epigenetische Mechanismen, vermittelt durch DNA-Methylierungen, Histonmodifikationen und RNA-Derivate, ermöglichen die distinkte Regulation der Genaktivität. Welche Rolle die DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) bei der postmitotischen Entwicklung von kortikalen Interneuronen spielt, ist eine der zentralen Fragen dieser Arbeit. Zur Aufklärung wurden Untersuchungen an einem konditionalen Mausmodels durchgeführt, in dem *Dnmt1* in Zellen der Interneuronen-generierenden *Hmx3*-Population deletiert wurde (*Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1 loxP<sup>2</sup>*).

Die Wanderung unreifer Interneurone aus den subpallialen Proliferationszonen in die entsprechenden kortikalen Bereiche erfordert die Ausbildung und den Erhalt einer typischen migratorischen Morphologie. Diese unterscheidet sich deutlich von der komplexen Gestalt ausdifferenzierter Neurone. Die postmitotische Deletion von *Dnmt1* führte in *Hmx3*-abstammenden Interneuronen aus dem präoptischen Areal (POA) zu einem Verlust ihrer migratorischen Morphologie und zu einer gesteigerten zellulären Komplexität. Die Migrationsdynamik zeigte sich sichtbar gestört und die Vitalität der *Dnmt1*-defizienten Zellen war deutlich reduziert.

Vergleichende Transkriptomanalysen von wildtypischen und *Dnmt1*-defizienten Zellen zur Identifizierung potenzieller Zielgene von DNMT1 stellten eine erhöhte Expression von *Pak6* in *Dnmt1*-defizienten Zellen heraus, welche zu den beobachteten morphologischen Veränderungen beitrug. Eine nachträgliche Reduktion des *Pak6* Expressionsniveaus in *Dnmt1*-defizienten POA-Zellen führte zur Wiederherstellung der typischen migratorischen Morphologie.



Zusammengefasst in Pensold, Symmank et al. (2016) bekräftigen die Ergebnisse die Wichtigkeit der DNMT1-abhängigen Repression von *Pak6* während der migratorischen Phase unreifer Interneurone.

Weitere Untersuchungen zu potentiell durch DNMT1 regulierten Genen rückten den Transkriptionsfaktor LHX1 in den Fokus dieser Arbeit. Dessen Expression scheint ähnlich wie die von *Pak6* durch DNMT1 reguliert zu werden. LHX1 gehört zur Familie der LIM-Homeobox-Transkriptionsfaktoren mit bekannten Funktionen bei der Entwicklung von kortikalen, spinalen und zerebellären Interneuronen. Während der Embryonalentwicklung ist *Lhx1* im POA exprimiert und die Aufklärung von potenziellen Funktionen war Ziel des zweiten Abschnittes dieser Arbeit.

Hierfür wurde *Lhx1* postmitotisch in POA-abstammenden Zellen der *Hmx3*-Population deletiert (*Hmx3-Cre/tdTomato/Lhx1 loxP<sup>2</sup>*). Umfangreiche phänotypische Analysen von embryonalen und adulten Mausstadien ließen vermuten, dass der Transkriptionsfaktor insbesondere das Überleben jener postmitotischen Zellen begrenzt. *In vitro* Studien an kultivierten Primärzellen und immortalisierten Neuroblastomazellen bestätigten die LHX1-abhängige Regulation der Zellmortalität. Dabei konnten quantitative Expressionsstudien vor allem eine durch LHX1 regulierte Expression von Mitgliedern der BCL2-Familie herausstellen, welche apoptotische Prozesse steuert. Somit beeinflusst DNMT1 auch über die Regulation des Transkriptionsfaktor LHX1 das Überleben jener Zellen.

Darüber hinaus wurde eine mögliche Beteiligung von LHX1 an der Lenkung migrierender POA-abstammender Interneurone auf dem Weg zum Kortex herausgestellt. Diesbezüglich konnte *in vitro* mit UNC5B ein wichtiger LHX1-abhängiger Rezeptor identifiziert werden, welcher auch in POA-abstammenden Interneuronen für die Vermittlung von Richtungssignalen relevant sein könnte.

Weitere Untersuchungen hinsichtlich des genauen Regulationsmechanismus konnten jedoch weder für *Pak6* noch für *Lhx1* eine direkte Transkriptionskontrolle durch DNMT1-vermittelte DNA-Methylierung herausstellen. Mittels Chromatin-Immunpräzipitation wurde hingegen eine von DNMT1 abhängende Assoziation der repressiven Histonmarkierung H3K27me3 an regulatorischen Genregionen von *Pak6* und *Lhx1* detektiert. Diese könnte für die Repression der beiden untersuchten Gene bestimmend sein. Insgesamt zeigen die dargestellten Ergebnisse, dass eine durch DNMT1 vermittelte komplexe Genregulation essentiell für die Migration und Vitalität von POA-abstammenden Interneuronen ist.

## **1.2. Summary**

A precise balance between excitation and inhibition is crucial for neocortical function. Cortical GABAergic interneurons modulate the signal transmission in interconnected networks and defects in their development are associated with various diseases, which necessitates the elucidation of relevant regulators. During brain development immature interneurons undergo a prolonged period of post-mitotic differentiation and maturation generating a high number of diverse neuronal subtypes. In addition to the subtype-specific migration from their subpallial origin into cortical areas, this period also includes the development of characteristic cellular properties. Therefore, a strictly regulated but also flexible control of gene expression is crucial for proper development.

Epigenetic mechanisms mediated by DNA methylation, histone modifications and RNA derivatives enable a multi-faceted regulation of gene activity. Hence, one main questions of this thesis was to investigate the role of the DNA methyltransferase 1 (DNMT1) for the post-mitotic development of cortical interneurons. For this, analysis of conditional knockout mice were performed, in which *Dnmt1* was deleted in cells of the interneuron-generating *Hmx3*-population (*Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1 loxP<sup>2</sup>*). The migration of immature interneurons from the basal telencephalon into cortical regions requires the formation and maintenance of a typical migratory morphology, which is clearly different from the complex shape of differentiated neurons. Upon post-mitotic deletion of *Dnmt1* in *Hmx3*-derived interneurons of the preoptic area (POA), these cells lost their migratory morphology and revealed increased cellular complexity. Furthermore, disturbed migration dynamics were detectable and the vitality of the *Dnmt1*-deficient cells was significantly reduced.

Comparative transcriptome analysis of wild-type and *Dnmt1*-deficient cells revealed potential target genes of DNMT1, among them *Pak6*. *In vitro* experiments confirmed that the morphological changes of *Dnmt1*-deficient cells were related to an increased *Pak6* expression level, which could be restored by depleting *Pak6* expression. As also summarized in Pensold, Symmank et al. (2016) this work provides evidence for the importance of DNMT1-dependent repression of *Pak6* during the migratory period of immature interneurons.

Further studies on genes potentially regulated by DNMT1 revealed also *Lhx1* as one target, which alike *Pak6* seems to underlie the transcriptional control of DNMT1. LHX1 belongs to the family of LIM homeodomain transcription factors with known functions in the development of cortical, spinal and cerebellar interneurons. During embryonic development, *Lhx1* expression was detected in the POA and the elucidation of potential functions was the aim of the second part of this thesis.

For analysis of its role, *Lhx1* was deleted in *Hmx3*-expressing cells in a conditional mouse model (*Hmx3-Cre/tdTomato/Lhx1<sup>loxP2</sup>*). Comprehensive phenotypic analysis of embryonic and adult mouse stages suggested that the transcription factor limits the survival of the *Hmx3*-deriving POA cells. *In vitro* studies on cultured primary cells and immortalized neuroblastoma cells confirmed an LHX1-dependent regulation of cell mortality. Furthermore, quantitative expression studies identified BCL2 family members as target genes of the transcription factor LHX1 regulating apoptotic events in several cell types. Thus, DNMT1 also affect the survival of *Hmx3*-deriving POA cells via the transcriptional control of LHX1.

Moreover, this study provide evidence for a LHX1-dependend transcriptional regulation of genes encoding for guidance receptors contributing to the regulation of migration through the basal telencephalon. In this regard, UNC5B receptor was identified to be LHX1-dependend playing a potential role in sensing guidance cues. Interestingly, further studies on the mechanism of DNMT1-dependend transcriptional control of *Pak6* and *Lhx1* could not reveal a direct regulation by DNMT1-mediated DNA methylation, neither for *Pak6* nor *Lhx1* gene locus. Instead, chromatin immunoprecipitation uncovered a DNMT1-dependent association of the repressive histone mark H3K27me3 at *Pak6* and *Lhx1* regulatory gene regions possibly regulating transcriptional activity. Overall, the results of this thesis have shown that a complex regulation of gene expression mediated by DNMT1 is essential for the migration and vitality of POA-derived interneurons ensuring their proper development.

## 2. Einleitung

Während der Evolution der Säugetiere hat der Neokortex, welcher für die Integration und Verarbeitung von komplexen Informationen zuständig ist (Kaas, 1987), überproportional an Größe und Komplexität zugenommen (Rakic, 2009; Lui et al., 2011; Fernandez et al., 2016; Wilsch-Brauninger et al., 2016). Seine biologische Evolution steht dabei in Verbindung mit erweiterten Fertigkeiten bei der Wahrnehmung komplexer Zusammenhänge, im logischen Denken und der umfassenden Gedächtnisbildung, sowie mit Verbesserungen der sprachlichen und feinmotorischen Fähigkeiten (Sawaguchi, 1992; Dunbar und Shultz, 2007; Sherwood et al., 2008; Rakic, 2009; Defelipe, 2011; Heyes, 2012).

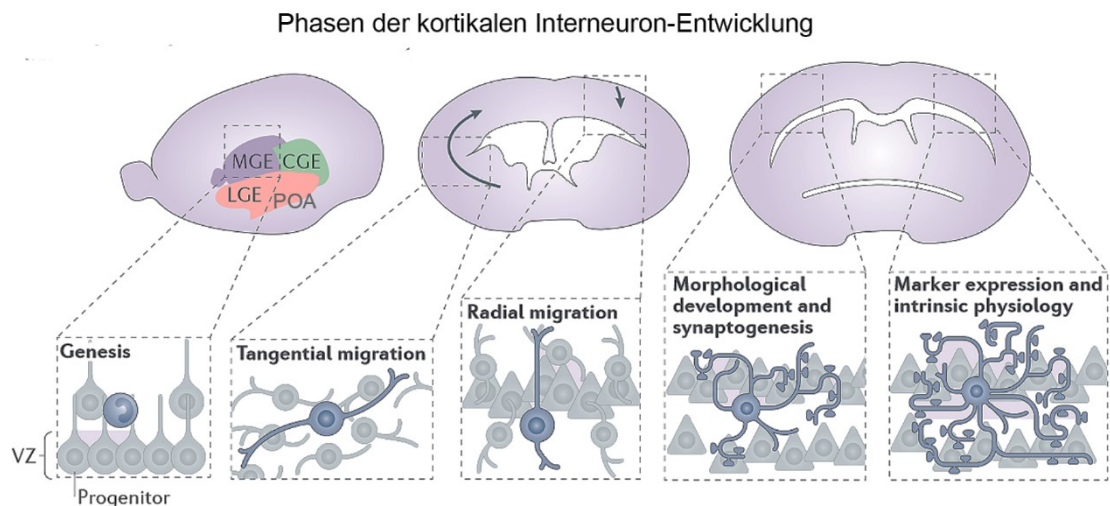
Die Funktionalität des Neokortex beruht dabei auf überaus komplexen Netzwerken verschiedenster Zellen, welche in ihrer Gesamtheit die Aufnahme, Weiterleitung und Verarbeitung von relevanten Informationen realisieren (Harris und Shepherd, 2015; Yau et al., 2015). Exzitatorische Projektionsneurone bilden dabei den Hauptteil aller neuronalen Zellen dieser Netzwerke (Costa und Muller, 2014; Kumamoto und Hanashima, 2014). Ihre Hauptfunktion, die Weiterleitung elektrischer Signale, wird dabei durch die hochdiverse Gruppe von inhibitorischen GABAergen Interneuronen moduliert (Wonders und Anderson, 2006; Druga, 2009; Merot et al., 2009; Gelman und Marin, 2010; Kepecs und Fishell, 2014; Tremblay et al., 2016).

Es ist plausibel, dass Störungen bei der kortikalen Entwicklung und der Etablierung der korrekten Netzwerkkonnektivität zu teils schweren neuropsychologischen und -psychiatrischen Störungen führen können (Rubenstein und Merzenich, 2003; Levitt et al., 2004; Lewis et al., 2005; Rossignol, 2011; Rubenstein, 2011; Chattopadhyaya und Cristo, 2012; Marin, 2012; Volk und Lewis, 2014; Tatti et al., 2017). Hierbei ist im Hinblick auf eine korrekte, kortikale Entwicklung bemerkenswert, wie aus genetisch identischen Vorläufern eine Mannigfaltigkeit an Zelltypen mit unterschiedlichsten Funktionen und Spezifitäten entstehen kann.

Die Generierung der neuronalen Vielfalt und die Ausbildung einer adäquaten Verschaltung, sowie von funktionellen Netzwerken wird dabei während der Entwicklung über eine räumlich und zeitlich spezifische Genexpression realisiert (Campbell, 2005; Flames und Marin, 2005; Gelman und Marin, 2010; Marin und Muller, 2014; Jiang et al., 2015; Govindan und Jabaudon, 2017; Lein et al., 2017; Wamsley und Fishell, 2017).

## **2.1. Entwicklungsrelevante Prozesse kortikaler Interneurone**

Die Entwicklung kortikaler Interneurone kann in einzelne Phasen eingeteilt werden, wie in der schematischen Abbildung 1 vereinfacht dargestellt ist. Unreife Interneurone müssen nach ihrer Entstehung in den Proliferationszonen außerhalb des Kortex zu ihrer korrekten kortikalen Position migrieren, wo sie anschließend reifen (Gelman und Marin, 2010; Faux et al., 2012; Kepecs und Fishell, 2014; Tremblay et al., 2016; Bandler et al., 2017; Laclef und Metin, 2017). Die Reifung ist verbunden mit der Ausbildung typischer morphologischer und physiologischer Charakteristika, sowie der Expression von Markerproteinen (Wonders und Anderson, 2006; Gelman und Marin, 2010; Kepecs und Fishell, 2014; Tremblay et al., 2016).



**Abbildung 1: Phasen der kortikalen Interneuron-Entwicklung.** Unreife kortikale Interneurone werden im basalen Telencephalon in distinkten proliferativen Zonen (CGE, LGE, MGE, POA) gebildet. Anschließend migrieren sie tangential in den Kortex und radial zu ihrer Zielposition. Während der Reifungsphase erfolgen die Ausbildung typischer morphologischer Charakteristika und die Etablierung von synaptischen Kontakten. Zeitnah exprimieren kortikale Interneurone spezifische Markerproteine und zeigen bestimmte Aktivitätsmuster. CGE, caudale ganglionische Eminenz (GE); LGE, laterale GE; MGE, mediale GE; POA, präoptisches Areal; VZ, Ventrikularzone. Modifiziert nach Wamsley und Fishell (2017).

## **2.2. Intrinsische und extrinsische Determinierung kortikaler Interneurone**

Im adulten 6-schichtigen Neokortex können Interneurone aufgrund der Expression von biochemischen Markerproteinen wie Parvalbumin (PV), Somatostatin (SST), Vasointestinales Peptid (VIP), Neuropeptid Y (NPY), Calretinin (CR) und Reelin (RELN) unterteilt werden (Rudy et al., 2011; Gelman et al., 2012; Sultan et

al., 2013; Kepecs und Fishell, 2014; Laclef und Metin, 2017; Wamsley und Fishell, 2017). Weitere Unterteilungen hinsichtlich ihrer Subtyp-spezifischen morphologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften verdeutlichen ihre Vielfalt.

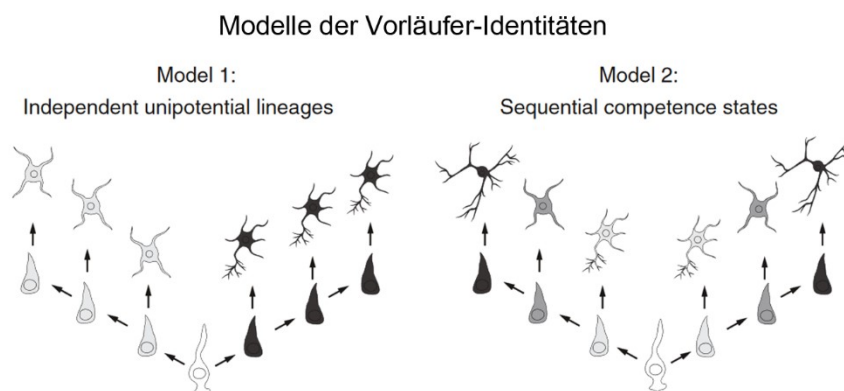
Die teils überaus diversen Interneuron-Subtypen entstehen, im Gegensatz zu exzitatorischen Projektionsneuronen, nicht direkt in der Ventrikular- und Subventrikularzone des sich entwickelnden Kortex (McConnell, 1991; O'Leary und Koester, 1993), sondern werden in transienten embryonalen Proliferationszonen im basalen Telenzephalon gebildet (Wonders und Anderson, 2006; Kelsom und Lu, 2013; Laclef und Metin, 2017). Zu diesen gehören die mediale, laterale und caudale ganglionische Eminenz (MGE, LGE und CGE) und das präoptische Areal (POA) (Anderson et al., 2001; Marin und Rubenstein, 2001; Corbin und Butt, 2011; DeFelipe et al., 2013; Kelsom und Lu, 2013; Sultan et al., 2013; Laclef und Metin, 2017). Dabei entstammt der größte Anteil kortikaler Interneurone der MGE (Wichterle et al., 1999; Marin et al., 2000; Anderson et al., 2001; Wichterle et al., 2001). Einige Populationen haben ihren Ursprung in anderen Zonen, wie dem POA (Gelman et al., 2009; Gelman et al., 2011; Rubin und Kessaris, 2013). Die Proliferationszonen im Subpallium sind jedoch auch der Ursprung von Interneuronen und Gliazellen, die für andere Hirnareale bestimmt sind (Kriegstein und Alvarez-Buylla, 2009; Laclef und Metin, 2017).

Inwieweit die finale Determinierung eines spezifischen Interneuron-Subtypen intrinsisch vorherbestimmt oder durch extrinsische Faktoren beeinflusst wird, ist eine zentrale Frage bei der Entwicklung der Interneuron-Vielfalt. Viele Studien betonen die Relevanz einer, zumindest zu gewissen Teilen, vorherbestimmten Differenzierung anhand gemachter Beobachtungen zu klonalen Beziehungen im Rahmen von Transplantationsexperimenten (Nery et al., 2002; Butt et al., 2005; Marin und Muller, 2014; Tyson und Anderson, 2014). Studien an MGE-abstammenden Interneuronen zeigen, dass ihre Reifung durchaus auf einer zeitlich progressiven Abfolge von Transkriptionsfaktoren (NKX2.1, LHX6, SOX6 und SIP1, SATB1) während ihrer embryonalen und frühen postnatalen Entwicklung basiert (Sussel et al., 1999; Liodis et al., 2007; Du et al., 2008; Azim et al., 2009; Batista-Brito et al., 2009; Close et al., 2012; Denaxa et al., 2012; McKinsey et al., 2013; Neves et al., 2013; van den Berghe et al., 2013; Vogt et al., 2014). Konditionale Deletionen einzelner entsprechender Gene hatten in fast allen Fällen drastische Veränderungen in der Expression entsprechender Marker (SST, PV) und

der Ausprägung typischer, physiologischer Eigenschaften zur Folge (Liodis et al., 2007; Azim et al., 2009; Batista-Brito et al., 2009; Close et al., 2012; Denaxa et al., 2012; Neves et al., 2013; van den Berghe et al., 2013). Jedoch waren auch Unterschiede in der kortikalen Lokalisierung auszumachen. Dies lässt eine mögliche Beteiligung extrinsischer Faktoren offen.

Auch wenn die Wichtigkeit von Umgebungsinformationen für die Reifung von kortikalen Interneuronen nicht abzusprechen ist (Mao et al., 1999; Pla et al., 2006; Tiveron et al., 2006; Li et al., 2008; Bortone und Polleux, 2009; Lodato et al., 2011; Denaxa et al., 2012), scheint eine aktivitätsabhängige postnatale Regulation von Genen bei der Ausbildung von Subtyp-spezifischen Eigenschaften von größerer Bedeutung zu sein (Bortone und Polleux, 2009; De Marco Garcia et al., 2011; Lodato et al., 2011; Dehorter et al., 2015). Jedoch ist weiterhin nicht geklärt, inwieweit hier intrinsisch determinierte genetische Programme aktiviert werden und letztendlich erneut zur Ausbildung der entsprechenden Eigenschaften führen.

Im direkten Zusammenhang mit der Differenzierung von Subtypen steht die Frage, wie aus denselben proliferativen Vorläufern während der Gehirnentwicklung überhaupt unterschiedliche Interneurone entstehen können und auf welcher Ebene hierbei eine intrinsische Determinierung stattfindet. Hierzu haben sich zwei Hypothesen herausgebildet (Abb. 2; (Laclef und Metin, 2017; Wamsley und Fishell, 2017)).



**Abbildung 2: Die intrinsische Determinierung von Vorläufern.** Es existieren zwei theoretische Modelle, welche erklären, wie Vorläufer einer Proliferationszone unterschiedliche Subtypen an kortikalen Interneuronen generieren können. Model 1 (Independent unipotential lineage) besagt, dass Vorläufer-Identitäten frühzeitig eingeschränkt sind und zeitlich versetzt die unterschiedlichen Subtypen generieren. Model 2 (Sequential competence states) beschreibt die Möglichkeit, dass die Kompetenz eines Vorläufers sich während der Entwicklung ändern kann und dieser so Ursprung verschiedener Subtypen sein kann. Aus Bandler et. al (2017).

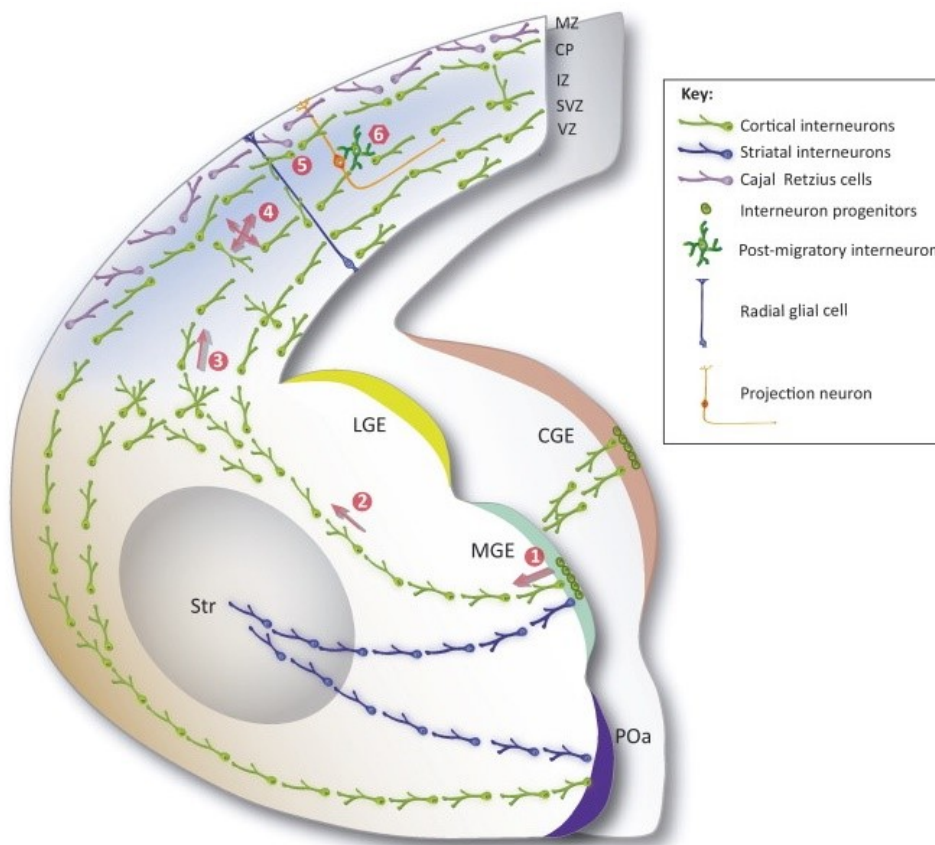
Die erste Hypothese besagt, dass innerhalb einer Proliferationszone verschiedene Vorläufer mit frühzeitig eingeschränktem Differenzierungspotential während der Entwicklung zeitlich versetzt die unterschiedlichen Subtypen generieren. Diese Hypothese basiert auf den Kenntnissen der klonalen Beziehungen von kortikalen Neuronen, welche bevorzugt radiale Einheiten ausbilden (Noctor et al., 2001). Inwieweit dies auch für kortikale Interneurone zutrifft, wird in einer Vielzahl von Studien diskutiert (Brown et al., 2011; Ciceri et al., 2013; Harwell et al., 2015; Mayer et al., 2015; Mayer et al., 2016; Sultan et al., 2016; Turrero Garcia et al., 2016), von denen jedoch die meisten eine alternative Hypothese unterstützen. Diese postuliert, dass aus einer einzelnen Vorläuferlinie zeitlich determiniert die unterschiedlichen Interneurone generiert werden. Hintergrund hierfür ist die weite Verteilung im gesamten Kortex von klonal-verwandten Interneuronen, sowie die Ausbildung unterschiedlicher Charakteristika (Harwell et al., 2015; Mayer et al., 2015; Mayer et al., 2016; Turrero Garcia et al., 2016). Dies bedarf einer flexibel regulierten Genexpression, um zu bestimmten Zeitpunkten spezifische Differenzierungsprogramme zu ermöglichen.

### **2.3. Die tangentielle und radiale Migration kortikaler Interneurone**

Während der ausgedehnten postmitotischen Entwicklungsphase migrieren unreife Interneurone aus den proliferativen Zonen des Subpalliums tangential in den Kortex, wo sie sich anschließend radial auf die entsprechenden kortikalen Schichten verteilen (Anderson et al., 1997; Marin, 2013; Guo und Anton, 2014; Laclef und Metin, 2017). Dabei nutzen sie verschiedene Migrationsrouten durch das basale Telenzephalon und im sich entwickelnden Kortex, welche je nach Ursprungsort und Zeitpunkt ihrer Generierung unterschiedlich favorisiert werden (Marin und Rubenstein, 2003; Metin et al., 2006; Hernandez-Miranda et al., 2010; Guo und Anton, 2014; Laclef und Metin, 2017). Unreife Interneurone aus der MGE vermeiden während ihrer tangentialen Migration in den Kortex das ventrale präoptische Areal und die striatale Anlage und nutzen den tiefen Migrationsweg (TMS) entlang der Subventrikularzone der LGE (Abb. 3; (Sussel et al., 1999; Wichterle et al., 2001; Ang et al., 2003; Marin und Rubenstein, 2003; Wichterle et al., 2003; Rudolph et al., 2010; Zimmer et al., 2011; Steinecke et al., 2014).



Im Gegensatz dazu migrieren POA-abstammende Interneurone bevorzugt lateral entlang des superfiziellen Migrationsweg (SMS) durch den sich entwickelnden, piriformen Kortex, vermeiden dabei aber ebenso die striatale Anlage (Abb. 3; (Gelman et al., 2009; Zimmer et al., 2011; Pensold et al., 2016). In MGE und POA haben darüber hinaus auch Interneurone für das Striatum ihren Ursprung (Marin et al., 2000).



**Abbildung 3: Migrationswege von unreifen kortikalen Interneuronen.** Die tangentielle Migration erfolgt entlang spezifischer Routen, die von dem Ursprungort der Interneurone im Subpallium und dem Zeitpunkt ihrer Generierung abhängt. Dabei ist die Expression eines spezifischen Rezeptorrepertoires zur Detektion von Lenkungsfaktoren notwendig. Initial werden unreife postmitotische Interneurone aus den proliferativen Zonen weggelenkt (1). MGE (und CGE) -abstammende Interneurone migrieren bevorzugt entlang des tiefen Migrationsweges (TMS) durch die LGE (2). POA-abstammende Interneurone nutzen vermehrt lateral den superfiziellen Migrationsweg in Richtung Kortex. In jedem Fall vermeiden kortikale Interneurone Nicht-Zielgebiete wie das Striatum, wohingegen striatale Interneurone sich in diesem ansiedeln. Abhängig vom Entwicklungszeitpunkt integrieren sich Interneurone in distinkte kortikale Migrationsströme in der VZ/SVZ, IZ und der MZ (3). Radiale Migrationsprozesse dienen der lokalen Orientierung im Kortex (4). Nach der finalen Migration in das entsprechende Zielareal (5) wird die Migration beendet und die Reifung zu funktionellen Interneuronen schreitet voran (6). CGE, caudale ganglionische Eminenz (GE); LGE, laterale GE; MGE, mediale GE; POa, preoptisches Areal; Str, Striatum; MZ, Marginalzone; CP, Kortikale Platte; IZ, Intermediärzone; SVZ, Subventrikularzone; VZ, Ventrikularzone. Aus Guo und Anton (2017).

Die zellspezifische Migration entlang räumlich und zeitlich distinkter Pfade wird durch eine Kombination verschiedener Umgebungssignale realisiert, welche durch Rezeptoren auf der Zellmembran migrierender Neurone detektiert werden können. Eine Reihe von iso- und heterochronischen Transplantationsexperimenten zeigte, dass intrinsische Mechanismen zellautonom Informationen für die Koordination der Migration vermitteln (Wichterle et al., 1999; Nery et al., 2002; Yozu et al., 2005; Tucker et al., 2006). Dies wird über eine kombinatorische Expression von Schlüsseltranskriptionsfaktoren in den proliferativen Zonen des Subpalliums realisiert, welche für die Regulation der Expression spezifischer Rezeptoren und zytoskelettaler Komponenten zuständig sind (Briscoe et al., 1999; Nadarajah et al., 2002; Cobos et al., 2005; Flames et al., 2007; Long et al., 2009; Flandin et al., 2011). So können motogene und attraktive Faktoren migrierende Zellen im basalen Telenzephalon auf bestimmten Pfaden halten und repulsive Faktoren die Migration in Nicht-Zielareale verhindern (Marin und Rubenstein, 2003; Guo und Anton, 2014). Die Proteinfamilie von Eph-Rezeptoren und ihren membranständigen Liganden, die Ephrine scheinen bei der Lenkung von unreifen Interneuronen eine große Rolle zu spielen. Sie sind dabei nicht nur ausschlaggebend für die initiale Abwanderung von kortikalen Interneuronen aus den Proliferationszonen im basalen Telenzephalon, sondern auch für die gelenkte, tangentielle Migration in Richtung Kortex (Zimmer et al., 2008; Rudolph et al., 2010; Zimmer et al., 2011; Steinecke et al., 2014). Zum Beispiel wird EPHA4 in unreifen Interneuronen aus der medialen ganglionischen Eminenz exprimiert (Zimmer et al., 2008; Zimmer et al., 2011). Die repulsive Interaktionen mit EFNA5-exprimierenden Zellen der subpallialen Ventrikularzone, sowie mit EFNB3-positiven Interneuronen des POA und EFNA3-positiven striatalen Zellen induziert die Vermeidung dieser Nicht-Zielareale (Zimmer et al., 2008; Rudolph et al., 2010; Zimmer et al., 2011; Steinecke et al., 2014). Da die Interaktion zwischen Eph-Rezeptoren und Ephrinen in den meisten Fällen bidirektional abläuft (Lisabeth et al., 2013; Kania und Klein, 2016), das heißt in beiden beteiligten Zellen Signalkaskaden zur Veränderung der Migrationsrichtung aktiviert werden können, werden auch POA-abstammende Interneurone von der MGE weggelenkt (Zimmer et al., 2011).

Zusätzlich vermitteln diffussible Proteine wie Slits über die Bindung an Robo-Rezeptoren (Hu, 1999; Wu et al., 1999; Zhu et al., 1999; Chen et al., 2001; Wichterle et al., 2003) und Klasse-3-Semaphorine über Interaktionen mit ihren

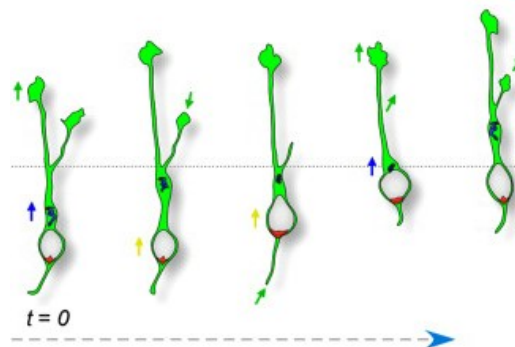
Rezeptoren Neuropilin 1 und Neuropilin 2 (Marin et al., 2001; Nobrega-Pereira et al., 2008; Zimmer et al., 2010) repulsive Effekte in Nicht-Zielgebieten wie dem Striatum, dem Septum und den Ventrikularzonen des Subpalliums. Attraktive Signale von membranständigen und sezernierten Neuregulinen fördern hingegen direkt, sowohl über kurze als auch lange Strecken, die Kortex-gerichtete Migration (Flames et al., 2004). Hinzukommend erhöhen Wachstumssignale, wie Neurotrophin 4, BDNF und GDNF die Motilität von migrierenden Interneuronen (Powell et al., 2001; Polleux et al., 2002; Pozas und Ibanez, 2005; Canty et al., 2009; Sanchez-Huertas und Rico, 2011). Darüber hinaus scheinen auch Neurotransmitter wie GABA, Glycin, Glutamate und Dopamin an der Migration kortikaler Interneurone beteiligt zu sein und dem Eintritt in den Neokortex zu fördern (Lopez-Bendito et al., 2003; Crandall et al., 2007; Avila et al., 2013).

Interneurone migrieren im sich entwickelnden Kortex in distinkten Strömen in der Marginalzone (MZ), Subplatte (SP), der Intermediärzone (IZZ) und der Subventrikular-/Ventrikularzone (SVZ/VZ) (Abb. 3; (Guo und Anton, 2014)). Zu gewissen Anteilen scheint die Wahl des entsprechenden kortikalen Migrationsstromes intrinsisch determiniert zu sein und abhängig vom Zeitpunkt und Herkunft der migrierenden Interneurone zu sein (Guo und Anton, 2014). So konnten Expressionsstudien eine Reihe von Lenkungsrezeptoren und intrazellulären Modulatorproteinen unterschiedlich exprimiert zwischen MZ- und IZ-migrierenden Interneuronen herausstellen (Antypa et al., 2011). In Kombination mit extrinsischen Faktoren, wie dem in der Marginalzone sezernierten Lenkungsmolekül Netrin 1 (Stanco et al., 2009), und auch durch Positionsinformation, die von kortikalen Cajal-Retzius Zellen vermittelt werden (Shinozaki et al., 2002; Alcantara et al., 2006; Zarbalis et al., 2012), können Routen-Priorisierungen realisiert werden. Haben Interneurone ihr Zielareal erreicht, wechseln sie von tangentialer zu radialer Migration um sich in die entsprechende kortikale Schicht zu integrieren (Abb. 3; (Marin, 2013; Guo und Anton, 2014; Laclef und Metin, 2017)). Die genauen Mechanismen hinsichtlich dem Übergang von tangentialer zu radialer Migration sind noch ungeklärt, jedoch scheint eine verringerte Resonanz auf den chemokinen Faktor CXCL12 hierbei eine Rolle zu spielen (Li et al., 2008; Lysko et al., 2011). Des Weiteren sind morphologische Veränderungen entscheidend für die tangential-radiale Richtungsänderungen, welche in kortikalen Interneuronen zum Beispiel durch die p21-aktivierte Proteinkinase PAK3 vermittelt werden (Cobos et al., 2007).

## **2.4. Die Morphologie von tangential migrierenden Interneuronen**

Die Ausbildung eines prominenten Führungsfortsatzes, dessen Verzweigungen und die Translokation des Zellkerns sind entscheidende Grundlagen für die typischerweise Gliazellen-unabhängige tangential Migration von unreifen kortikalen Interneuronen durch das basale Telenzephalon (Abb. 4; (Nadarajah und Parnavelas, 2002; Marin und Rubenstein, 2003)). Dabei orientieren sich die Führungsfortsätze zur Detektion von Umgebungssignalen nicht wie bei Projektionsneuronen stetig um, sondern verzweigen sich fortwährend neu, was das schnellere Absuchen eines größeren Areals ermöglichen soll (Britto et al., 2009; Martini et al., 2009; Marin et al., 2010).

Attraktive Signale führen zur Stabilisierung einer Fortsatzverzweigung und einer typischerweise zweiphasigen Nukleokinese in dessen Richtung (Morris et al., 1998; Walsh und Goffinet, 2000; Ridley et al., 2003; Bellion et al., 2005; Britto et al., 2009; Marin et al., 2010; Yanagida et al., 2012; Peyre et al., 2015; Tielens et al., 2016). Zuerst kommt es zu einer zytoplasmatischen Schwellung im stabilisierten Fortsatz, in welche Zentrosom und weitere Organellen verschoben werden (Bellion et al., 2005; Schaar und McConnell, 2005; Tsai und Gleeson, 2005). Als nächstes erfolgt die Translokation des Nukleus und abschließend werden destabilisierte Fortsätze zurückgebildet. Insgesamt ergibt sich dabei für tangential migrierende Interneurone eine saltatorische Migrationsdynamik (Polleux et al., 2002; Bellion et al., 2005; Valiente und Marin, 2010).



**Abbildung 4: Die typische Morphologie migrierender Interneurone.** Unreife Interneurone migrieren unabhängig von radialen Gliazellen durch saltatorische Fortbewegung über die Ausbildung von Führungsfortsätzen und der Translokation des Zellkerns in Migrationsrichtung. Führungsfortsätze zeigen dabei eine hochfrequente Verzweigung zur Realisierung von Richtungsänderungen. Attraktive Umgebungssignale führen zur Stabilisierung einer Fortsatzverzweigung und der Rückbildung der anderen. Die Nukleokinese erfolgt in zwei Schritten. 1. Bildung einer axonalen Schwellung, in welche das Zentrosom und weitere Organellen verlagert werden, 2. zytoskelettale Kräfte induzieren die Translokation des Nukleus. Abschließend erfolgt die Retraktion des Folgefortsatzes. Aus Valiente und Marin (2010)

Die Kinetik der Ausbildung und Verzweigung des Führungsfortsatzes, sowie der Nukleokinese wird dabei durch Aktin-Myosin-Kontraktionen und Veränderungen im Mikrotubuli-Netzwerk reguliert (Friocourt et al., 2007; Martini et al., 2009; Martini und Valdeolmillos, 2010; Steinecke et al., 2014; Tielens et al., 2016). Die Modulierung der Aktin-Myosin-Kontraktilität wird durch Mitglieder der Rho-Proteinfamilie (Rho, Rac, CDC42) vermittelt (Heasman und Ridley, 2008; Govek et al., 2011). Jene interagieren mit einer Vielzahl an Proteinkinasen, die darauffolgend extra- und intrazelluläre Signale für die Lenkung während der Migration durch Phosphorylierungen weitergeben können (Maekawa et al., 1999; Schmandke et al., 2007). So bewirkten zum Beispiel Manipulationen des Aktivitätslevels der GTPase RhoA durch Deletion der Proteinkinase p27 in unreifen kortikalen Interneuronen aufgrund einer Hyperaktivierung von Myosin-II relevante migratorische Defekte (Besson et al., 2004; Godin et al., 2012). Des Weiteren scheinen insbesondere p21-aktivierten Kinasen (PAK) distinkte Funktionen bei der Regulation von Rho-Proteinen zu haben und über diverse Mechanismen zu wirken (Zhao und Manser, 2005). Defekte entsprechender Proteine des Zytoskeletts und ihrer Regulatoren führen häufig zu Defiziten in der Zellmigration und einem vorzeitigem Zelltod (Bellion et al., 2005; Schaar und McConnell, 2005; Martini und Valdeolmillos, 2010; Steinecke et al., 2014).

## **2.5. Das Überleben von Interneuronen während der Migration und Reifung**

Zur Sicherung der Etablierung eines ausgeglichenen Netzwerkes von Exzitation und Inhibition, führen Defekte in relevanten Entwicklungsprozessen von Interneuronen in vielen Fällen zu einer erhöhten Zellmortalität (Uribe und Wix, 2012). Auch wenn alternative Wege existieren (Yuan et al., 2003), werden neuronale Zellen in den meisten Fällen durch den programmierten Zelltod eliminiert (Buss et al., 2006; Dekkers und Barde, 2013). Hierbei existieren verschiedenste Proteinfamilien in quervernetzten Signalwegen, welche die Integration und Prozessierung von extra- und intrazellulären Signalen und die Aktivierung von Zelltod- oder Überlebensprogrammen realisieren (Dekkers und Barde, 2013; Kristiansen und Ham, 2014; Pfisterer und Khodosevich, 2017). In neuronalen Zellen regulieren neben einer Vielzahl anderer Faktoren, unter anderem Mitogen-aktivierte Kinasen (MAPK) und Mitglieder der BCL2-Proteinfamilie das Überleben während

ihrer Entwicklung (Morrison et al., 2002). Dabei existieren in beiden Proteinfamilien sowohl Mitglieder, die für das Überleben fördernde Effekte vermitteln, als auch solche, die Zelltod-induzierende Signalkaskaden aktivieren (Fukunaga und Miyamoto, 1998; Akhtar et al., 2004).

Abseits von Defekten, ist eine regulierte Phase des postnatalen Interneuron-Sterbens essentiell für die Justierung der adäquaten Zellzahl im adulten Kortex, da Interneurone während der Gehirnentwicklung in größerer Anzahl entstehen als final für die Funktionalität kortikaler Schaltkreise benötigt werden (Miller, 1995; Southwell et al., 2012; Denaxa et al., 2017). Hierbei scheinen apoptotische Abläufe intrinsisch determiniert zu sein, wie Transplantations-experimente von embryonalen unreifen Interneuronen in den postnatalen Kortex zeigten (Southwell et al., 2012). In jenen Interneuronen wurde die Apoptose in einem ähnlichen Zellalter aktiviert, wie auch in sich endogen entwickelten kortikalen Interneuronen. Das Ausmaß des Interneuron-Sterbens während der kritischen postnatalen Phase scheint jedoch zu einem gewissen Maß plastisch zu sein und Zelltyp-spezifisch durch neuronale Netzwerkaktivität beeinflusst zu werden (Denaxa et al., 2017). So scheint es vielmehr eine Kombination eines intrinsisch determinierten Zellschicksals und extrinsischen Faktoren zu sein, welche das Überleben zumindest in der kritischen postnatalen Phase regulieren.

## **2.6. LIM-Homeobox-Transkriptionsfaktoren in der Entwicklung von Interneuronen**

Die zeitlich und räumlich distinkte Expression von Transkriptionsfaktoren spielt für Entwicklung der unterschiedlichen Subtypen kortikaler Interneurone eine entscheidende Rolle (Puelles und Rubenstein, 1993; Puelles und Rubenstein, 2003; Cobos et al., 2006; Flames et al., 2007). In MGE-abstammenden Interneuronen ist zum Beispiel die Expression von LHX6 entscheidend für die adäquate tangential Migration, die Integration in entsprechende kortikale Schichten und die Ausbildung entsprechender Subtyp-spezifischen Charakteristiken (Alifragis et al., 2004; Liodis et al., 2007; Zhao et al., 2008; Neves et al., 2013). Mit seinen zwei typischen LIM-Domänen und der für die DNA-Bindung wichtigen Homeodomäne (HD) gehört LHX6 zu der Familie der LIM-Homeobox (LIM-HD)-Transkriptionsfaktoren (HD vom engl. „homeodomain“) (Sanchez-Garcia et al., 1993; Kuroda et al., 1996; Hobert und

Westphal, 2000; Zheng und Zhao, 2007) (Dawid et al., 1998; Dawid und Chitnis, 2001). Homeobox-Gene kodieren dabei in der Regel immer für entscheidende Transkriptionsfaktoren, die während der Embryonalentwicklung den grundlegenden Bauplan eines Organismus festlegen und durch die Regulation untergeordneter Genkaskaden wichtige Zell- und Gewebe-spezifisierende Prozesse steuern (Gehring et al., 1994; Banerjee-Basu und Baxevanis, 2001). Mutationen in homeotischen Genen sind daher meist letal (Mallo et al., 2010; Philippidou und Dasen, 2013). Zusätzlich zur Homeodomäne verfügen LIM-HD-Proteine noch über zwei evolutionär stark konservierte Cystein-reiche Zinkfinger motive, die in dieser Transkriptionsfaktorfamilie vor allem Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (Sanchez-Garcia et al., 1993; Kuroda et al., 1996; Zheng und Zhao, 2007). Somit kann eine spezifische Aktivität insbesondere über die Interaktion mit verschiedensten Kofaktoren und der Beteiligung an unterschiedlichen Transkriptionskomplexen realisiert werden (Dawid et al., 1998). Gemeinsam haben die meisten Vertreter jedoch eine intensive Beteiligung an zerebralen Entwicklungsprozessen und Mutationen führen oft zu starken Fehlbildungen und frühzeitigem Abort (Zheng und Zhao, 2007). Zum Beispiel führt der Verlust der *Lhx2* Expression zur teilweisen und kompletten Fehlbildung der Augenanlagen, Hypoplasie des Neokortex und Aplasie der hippocampalen Anlagen (Porter et al., 1997; Bulchand et al., 2001). Noch weitreichender sind die Folgen eines totalen *Lhx1* Knockouts, der zum kompletten Verlust des Vorder- und Mittelhirns führt (Shawlot und Behringer, 1995; Hukriede et al., 2003). Ähnlich wie LHX2 hat auch der LIM-HD-Transkriptionsfaktor LHX1 nicht nur Funktionen in der Organogenese, sondern auch bei der Fetogenese. Diesbezüglich reguliert LHX1 neben der Differenzierung von Purkinje-Zellen im Cerebellum (Zhao et al., 2007) und der Migration von Motorneuronen im Rückenmark (Palmesino et al., 2010), insbesondere die Entwicklung von spinalen Interneuronen (Pillai et al., 2007). Inwieweit LHX1 auch für die Entwicklung kortikaler Interneurone relevant ist, wurde bisher noch nicht untersucht. Interessanterweise zeigte *Lhx1* eine signifikant erhöhte Expression im embryonalen präoptischen Areal, verglichen zur MGE, wie mittels *Next Generation Sequencing* (Pensold et al., 2016) und qPCR (unveröffentlichte Daten) von entsprechenden Gewebeproben bereits detektiert werden konnte.

## **2.7. DNA-Methylierung und die Vernetzung mit Histonmodifikationen**

Die große Vielfalt an neuronalen Subtypen beruht auf spezifischen Entwicklungsprogrammen, welche über die strikte Regulation einer differentiellen Genexpression realisiert werden. Epigenetische Mechanismen stehen dabei mehr als je zuvor im Mittelpunkt des Forschungsinteresses (Kim et al., 2009; Murrell et al., 2013; Cholewa-Waclaw et al., 2016). Epigenetische Expressionskontrolle wird durch RNA-Derivate, Histonmodifikationen und DNA-Methylierungen in einem teils komplexen Regulationsnetzwerk vermittelt (Chuang und Jones, 2007; Zhang und Pradhan, 2014).

DNA-Methyltransferasen (DNMT) übertragen Methylgruppen auf spezifische Cytosine der DNA und stark methylierte DNA-Bereiche sind zumeist mit einer verminderter Expression der entsprechenden Gene assoziiert (Fagiolini et al., 2009; Jin et al., 2011; Akbarian et al., 2013). Dabei rücken zusätzlich zu Promotorregionen auch intra- und extragene Bereiche hinsichtlich des Regulationspotentials, insbesondere bei sich in der Differenzierung befindlichen Neurone, immer mehr in den Fokus (Lister et al., 2013; Jang et al., 2017). Im Gegensatz zu den „*de novo*“ Methyltransferasen DNMT3A und B (Okano et al., 1999), wurde die Rolle von DNMT1 lange Zeit vor allem in der Komplettierung der Methylierung nach der Zellteilung gesehen (Hermann et al., 2004; Hirasawa et al., 2008), da sie zu hemimethylierter DNA eine erhöhte Affinität aufweist (Bashtrykov et al., 2012; Bashtrykov et al., 2012). Diese Eigenschaft macht DNMT1 für proliferative Zellen enorm wichtig, wie der selektive Knockout von *Dnmt1* in Zellen des Nervensystems belegt (Fan et al., 2001). Dieser führte, ähnlich wie die Deletion in sich teilenden somatischen Zellen, zu einer stark erhöhten Letalität (Li et al., 1992; Fan et al., 2001; Jackson-Grusby et al., 2001; Trowbridge et al., 2009; Sen et al., 2010).

Die Expression von DNMT1 in postmitotischen Neuronen lässt vermuten, dass diese DNA-Methyltransferase auch unabhängig von der Methylierungserhaltung nach der Zellteilung weitere Funktionen hat (Chestnut et al., 2011; Kadriu et al., 2012). Dies unterstützend führte eine konditionale Deletion von *Dnmt1* in embryonalen, exzitatorischen und hippocampalen postmitotischen Neuronen zu Defekten in ihrer Reifung und einer erhöhten Zellmortalität (Hutnick et al., 2009). So konnte in jenen Zellen, sowohl während ihrer Entwicklung als auch im weiteren Verlauf, eine generelle Hypomethylierung der DNA zusammen mit einer

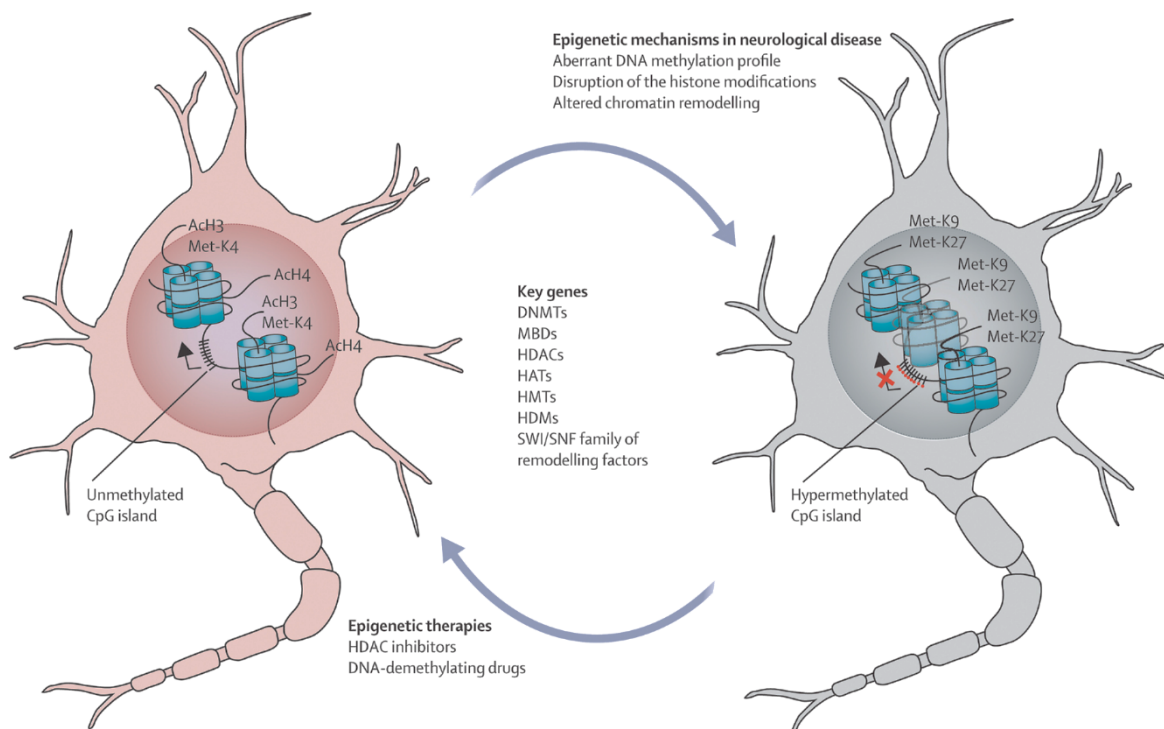


abnormalen Expression von Zelltod- und Reifegenen detektiert werden (Hutnick et al., 2009). Darüber hinaus scheint DNMT bei der Neurogenese eine frühzeitige astrogliale Differenzierung im sich entwickelnden Kortex durch Methylierung von Genen zu unterdrücken, die typischerweise in Astrozyten exprimiert werden (Fan et al., 2005). Auch die terminale Differenzierung und das Überleben von Fotorezeptoren und Interneuronen in der postnatalen Retina werden durch DNMT1 gesichert (Rhee et al., 2012).

Neben der wichtigen Rolle bei der neuronalen Entwicklung, hat die DNMT1-vermittelte DNA-Methylierung bei der Regulation von relevanten Genen an adulten Stadien und auch während des Alterns, sowie bei bestimmten neurologischen und -psychiatrischen Erkrankungen essentielle Funktionen (Liu et al., 2011; Johnson et al., 2012; Grayson und Guidotti, 2013; Baets et al., 2015; Jung und Pfeifer, 2015).

Jedoch wird zunehmend deutlich, dass eine intensive Vernetzung mit Histonmodifikationen, darunter vor allem Acetylierung und Methylierung, die Genexpression regulieren und weniger die DNA-Methylierungen allein (Abb. 5; (Cedar und Bergman, 2009; Urdinguio et al., 2009; Du et al., 2015). Studien zeigen, dass unmethylierte DNA Regionen vermehrt mit acetylierten Histonen assoziiert sind und *vice versa* (Eden et al., 1998; Hashimshony et al., 2003). Es konnte eine Reihe von Proteinen charakterisiert werden, die eine Methyl-Cytosin-Bindungsdomäne (MBD) besitzen und so Histon-Deacetylasen (HDAC) zu methylierten Regionen rekrutieren können (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998). HDACs entfernen die Acetylierung an Histon H3 und H4, welche durch Histon-Acetyltransferasen (HAT) vermittelt werden und grundsätzlich zu einer Öffnung der Chromatin-Packungsdichte führen (Eberharter und Becker, 2002). Sie sind daher mit einer erleichterten Lesbarkeit der entsprechenden Gene verbunden (Eberharter und Becker, 2002). Veränderungen im Chromatin-Status werden dabei über den SWI/SNF Chromatin-Remodeling Komplex realisiert (Tang et al., 2010; Wu, 2012). Darüber hinaus gibt es auch deutliche Hinweise darauf, dass DNA-Methylierungen die Ausbildung von aktivierenden Histon-Methylierungen, zum Beispiel an H3K4 inhibieren und die von repressiven Methylierungen, wie an H3K9 und H3K27 fördern (Hashimshony et al., 2003; Lande-Diner et al., 2007). Dies soll vor allem die Stilllegung entsprechender Gene sicherstellen. Dabei werden Methylierungen an spezifischen Lysinresten des endständigen Aminosäurearms

von H3 durch Histon-Methyltransferasen (HMT) durchgeführt, wohingegen Histon-Demethylasen (HDM) die Methylgruppen entfernen. Eine direkte Interaktion von DNA- und Histonmethylierenden Enzymen ist über spezifische Bindungsdomänen möglich und reguliert einerseits die katalytische Aktivität des jeweiligen Bindungspartners und andererseits die Rekrutierung weiterer Proteine zur Bildung von regulatorischen Komplexen (Vire et al., 2006; Smallwood et al., 2007; Clements et al., 2012).



**Abbildung 5: Epigenetische Netzwerke regulieren die Genexpression.** DNA-Methyltransferasen (DNMT) übertragen Methylgruppen auf Cytosine der DNA, was mit einer Repression entsprechende Gene assoziiert ist. Proteine mit einer Methyl-Cytosin-Bindedomäne (MBD) vermitteln die Interaktion von DNA-Methylierung mit weiteren epigenetischen Mechanismen. Methylierung von Lysinen (K) an endständigen Aminosäureketten von Histon H3 (H3K9me2/3; H3K27me3) durch Histonmethyltransferasen (HMT) führen zur Genrepression. Histondemethylasen (HDM) reduzieren die Methylierung an Histon. Eine verringerte Methylierung von H3K9 und K27, zusammen mit einer erhöhte Methylierung von H3K4 unterstützt eine aktive Gentranskription. Histonacetylierung durch Histonacetyltransferasen (HAT) führt zur Öffnung der Packungsdichte des Chromatins, vermittelt durch Proteine der SWI/SNF-Familie. Histondeacetylasen (HDAC) führen zur Chromatinkondensation und Genrepression. In neurologischen und neuropsychiatrischen Erkrankungen ist oftmals die epigenetische Genregulation verändert. Therapiemöglichkeiten sind nur ansatzweise etabliert. Ac, acetyliert; DNMT, DNA-Methyltransferase; HAT, Histonacetyltransferasen; HDAC, Histondeacetylasen; HDM, Histondemethylasen; HMT, Histonmethyltransferasen; MBD, Methyl-Cytosin-Bindungsdomäne-Proteine; Met, methyliert; Aus Urduingio et al. (2009)

Aberrante DNA-Methylierungs- und Histonmodifikationsprofile, zumeist verbunden mit veränderten Chromatinzuständen, sind bei der Manifestierung von entwicklungs-neurobiologischen und neurodegenerativen Krankheiten, sowie verschiedenster neurophysiologischer und -psychiatrischer Störungen beteiligt (Urdinguio et al., 2009). Epigenetische Therapieansätze bieten Möglichkeiten über die Applikation von HDAC Inhibitoren und von Medikamenten, die eine Demethylierung der DNA veranlassen, die Ausprägung einzelner Erkrankungen einzudämmen (Urdinguio et al., 2009; Heerboth et al., 2014). Jedoch mangelt es diesen oft an der Spezifität, was die intensive pharmakologische Forschung antreibt.

### 3. Zielstellung

Für die adäquate Realisierung der für die postmitotische Entwicklung von Interneuronen relevanten Prozesse, wie der Migration und der Erhaltung der Zellvitalität, ist eine strenge Regulation der Genexpression von großer Bedeutung. Epigenetische Mechanismen wie die DNA-Methylierung bieten im Vergleich zur transkriptionellen Kontrolle durch Transkriptionsfaktoren eine übergeordnete globale Regulationsmöglichkeit. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1), sowie des ihr untergeordneten LIM-Homeobox-Transkriptionsfaktors LHX1 bei der embryonalen Entwicklung von POA-abstammenden Interneuronen aufzuklären.

#### **3.1. Charakterisierung des Einflusses von DNMT1 auf die postmitotische Entwicklung von POA-abstammenden Interneuronen**

Im ersten Abschnitt der Arbeit sollten umfassende phänotypische Analysen am Entwicklungstag E16 an konditionalen *Hmx3-Cre/tdTomato* wildtypischen und *Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1 loxP<sup>2</sup>* Knockout-Mäusen durchgeführt werden um einen Einfluss von DNMT1 auf POA-abstammende Interneurone zu eruieren. In Knockout-Tieren wurde dabei *Dnmt1* in der Interneuron-generierenden Population *Hmx3*-exprimierender postmitotischer POA-Zellen deletiert. Zur Charakterisierung der Morphologie und der Dynamik migrierender *Dnmt1*-defizienter Zellen dieser Mauslinie sollten an E16 morphologische Parameter in Hirnschnitten ausgewertet. Desweiteren sollten Zeitrafferaufnahmen an kultivierten, organotypischen Hirnschnitten zur Analyse der Migration durchgeführt und analysiert werden. In diesem Zusammenhang sollte *in vivo* an kultivierten Primärzellen und immortalisierten Neuroblastomazellen untersucht werden, welche Rolle die durch DNMT1 regulierte Proteinkinase PAK6 bei der Regulation der Morphologie und Vitalität einnimmt.

Da DNMT1 auch unabhängig von der direkten Methylierung von Gensequenzen die Expression einer Vielzahl von Transkripten reguliert, sollte darüber hinaus die Beeinflussung der repressiven Histonmarkierung H3K27me3 durch

Immunfluoreszenzdetektion im Allgemeinen und mittels Chromatinimmuno-präzipitation (ChIP) für *Pak6*-Promotorbereiche im Speziellen analysiert werden. Damit ließen sich Rückschlüsse auf die Vernetzung epigenetischer Mechanismen in unreifen Interneuronen ziehen.

### **3.2. Analyse der Rolle von LHX1 in der Migration und der Regulation des Überlebens unreifer Interneurone**

Im zweiten Abschnitt sollten die Funktionen des Transkriptionsfaktors LHX1 eruiert werden. Mittels ChIP gegen H3K27me3 sollte zuerst der von DNMT1 abhängige, jedoch DNA-Methylierungsunabhängige Regulationsmechanismus untersucht werden. Umfassende phänotypische Analysen von konditionalen *Hmx3-Cre/tdTomato/Lhx1 loxP<sup>2</sup>* Knockout-Mäusen an embryonalen als auch adulten Stadien sollten die entwicklungsrelevante Rolle von LHX1 bei der Regulation der Migration und der Vitalität unreifer POA-abstammender Interneurone herausstellen. Zur Validierung der Beobachtungen waren Knockdown-Versuche an kultivierten wildtypischen Primärzellen und immortalisierten N2a-Zellen notwendig. Dabei wurde die Zelltod-regulierende Funktion von LHX1 durch quantitative Expressionsbestimmungen von untergeordneten Apoptose-Regulatoren untersucht. Weiterhin wurde zur Aufklärung der gerichteten Migration von POA-abstammenden Interneuronen ein für die neuronale Migration relevanter Rezeptor - UNC5B - hinsichtlich seiner von *Lhx1*-abhängigen Expression *in vitro* analysiert. Hiermit sollte eine mögliche Beeinflussung des Rezeptorrepertoires migrierender Interneurone durch LHX1 initial adressiert werden, um so Rückschlüsse auf die Ursachen der tangentialen Migrationspräferenz jener Zellen machen zu können.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Verwendete Organismen

#### 4.1.1. Versuchstiere, Haltung und Verpaarung

Für diese Arbeit wurden Mäuse des Wildtypstammes C57Bl/6J und transgene Mäuse auf einem genetischen C57Bl/6J-Hintergrund verwendet. Für Untersuchungen wurden folgende transgenen Mäuse genutzt:

- *Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1* und *Hmx3-Cre/tdTomato/Lhx1* wildtypische Mäuse, abgekürzt mit *Dnmt1* Wildtyp oder *Dnmt1* WT, beziehungsweise *Lhx1* Wildtyp oder *Lhx1* WT
- *Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1 loxP<sup>2</sup>* und *Hmx3-Cre/tdTomato/Lhx1 loxP<sup>2</sup>* wildtypische Mäuse, abgekürzt mit *Dnmt1* Knockout oder *Dnmt1* KO, beziehungsweise *Lhx1* Knockout oder *Lhx1* KO

Zur Etablierung der Wildtyp-Mauslinie wurden die *Hm3-Cre* Mauslinie (erhalten von Oscar Marin, King's College, London, UK; (Gelman et al., 2009)) mit der tdTomato Reportermauslinie (erhalten von Christian Hübner, Universitätsklinikum Jena, Deutschland; (Madisen et al., 2010)) gekreuzt. Dabei entsprechen *Dnmt1* WT und *Lhx1* WT den gleichen wildtypischen Mäusen, sind zum Verständnis jedoch wie beschrieben benannt. Erst durch Kreuzung der *Dnmt1/Lhx1* Wildtyp-Mauslinie mit *Dnmt1 loxP<sup>2</sup>* Mäusen (*Dnmt1* KO; B6;129S-Dnmt1tm4Jae/J, Jaenisch Laboratory, Whitehead Institute, U.S.A.; (Jackson-Grusby et al., 2001)) oder *Lhx1 loxP<sup>2</sup>* Mäusen (*Lhx1* KO; Nikita Williams, Holcombe Blv., Houston, U.S.A.; (Kwan und Behringer, 2002)) wurden die unterschiedlichen Knockout-Mauslinien erstellt.

Die Cre/loxP-vermittelte Deletion führt in *Dnmt1 loxP<sup>2</sup>* Mäusen zur Entfernung von Exon 4 und Exon 5 des *Dnmt1* Gens, was in einem *Dnmt1* Nullallel resultiert (Jackson-Grusby et al., 2001). In *Lhx1 loxP<sup>2</sup>* Mäusen induziert das Cre/loxP-System die Deletion der kodierenden Region des *Lhx1* Gens, was ebenso in einem Nullallel resultiert (Kwan und Behringer, 2002).

Die Haltung der Tiere entsprach den Richtlinien der Universität Jena und dem Universitätsklinikum Jena und erfolgte unter Standardbedingungen bei 21 °C und einen 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus mit Wasser und Futter *ad libidum*. Zur terminierten Verpaarung der Mäuse wurden diese über Nacht

zusammengebracht und der Folgetag als Embryonaltag 1 (E1) festgelegt. Sowohl wildtypische als auch *Dnmt1* und *Lhx1* Knockout-Tiere zeigten keinen sichtbaren Belastungsphänotyp.

#### **4.1.2. Wirtsbakterien**

Zur Vervielfältigung der für die Herstellung von RNA-Sonden generierten Vektoren wurden chemisch kompetente Wirtsbakterien (*Escherichia coli*) des Stammes DH5 $\alpha$  verwendet.

#### **4.1.3. Zellkulturlinien**

Immortalisierte Neuroblastoma (N2a)-Zellen wurden für die Analyse der Morphologie und der RNA- und Proteinexpression verwendet. Die Kultivierung erfolgte, solange nicht anders benannt, in Dulbecco's modified Eagle's Medium mit hohem Glucose-Gehalt (DMEM; Invitrogen, U.S.A) mit 10% Fetalem Kälberserum (FBS), 100 U/ml Penicillin (Pen) und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin (Strep) bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> in einer humiden Atmosphäre.

### **4.2. Zellbiologische Mechanismen**

#### **4.2.1. Steriles und RNase-freies Arbeiten**

Alle Arbeiten mit lebenden Zellen wurden soweit wie möglich unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Es wurden sterile Puffer, Medien, Gerätschaften, Glaswaren und Verbrauchsmaterialien verwendet. Flüssigkeiten wurden vor Nutzung entweder 21 min bei 120 °C autoklaviert oder steril filtriert. Gerätschaften, wurden zuvor mit 70 % Ethanol desinfiziert und Glaswaren entweder 21 min bei 120 °C autoklaviert oder 6 h bei 180 °C erhitzt.

Arbeiten zum Zwecke der Untersuchung von RNA wurden soweit wie möglich RNase-frei durchgeführt. Flüssigkeiten ohne nukleophile Substanzen wurden mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) für 60 min pro Liter behandelt und anschließend autoklaviert. Für alle eigens produzierten Puffer wurde doppelt destilliertes, DEPC-behandeltes Wasser verwendet. Arbeitsflächen und Gerätschaften wurden mit 70 % Ethanol und RNase-Dekontaminationslösung (100 mM NaOH, 0.5% SDS) gereinigt.

#### **4.2.2. Organentnahme und Präparation von Gehirngewebe**

Zur Organentnahme wurden Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion einer Überdosis Chloralhydrat (2,5 µg pro g Mausgewicht) getötet. Zur Präparation adulter Mäuse erfolgte, nach Feststellung des Todes, die transkardiale Perfusion für 5 min mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, pH 7,4) zur Eliminierung von Blut aus dem Körperkreislauf, gefolgt von 5 min 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS (pH 7,4) zur Fixierung. Anschließend wurden die Gehirne präpariert und 24 h in 4% PFA in PBS (pH 7,4) nachfixiert, sowie in 10% und 30% Sucrose in PBS (pH 7,4) cryo-geschützt. Jungtiere an P0 wurden direkt dekapitiert, ebenfalls 24 h in 4% PFA in PBS (pH 7,4) fixiert und anschließend cryo-geschützt.

Zur Präparation von Embryonen wurden die Muttermäuse wie zuvor beschrieben mit Chloralhydrat (2,5 µg pro g Mausgewicht) getötet. Die Embryonen wurden präpariert und sofort dekapitiert. Die Köpfe wurden für 5-6 h entsprechend dem Altersstadium in 4% PFA in PBS (pH 7,4) fixiert und anschließend wie zuvor beschrieben cryo-geschützt. Gehirne für RNA-Detektionszwecke wurden unfixiert direkt nach der Präparation in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Gehirne zur Herstellung von Einzelzellen, sowie zur Anfertigung von organotypischen Hirnschnitten wurden steril in 4°C kalten Krebspuffer (126 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM D-Glucose, 12,5 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,4) präpariert.

#### **4.2.3. Herstellung von Gehirnschnitten und Free-Floating Schnitten**

Embryonale und P0-Gefrierschnitte, für die Detektion von RNA und Proteinen, wurden mit Hilfe eines Kryotoms (CM1900, Leica) bei -22 °C hergestellt. Gefrorene Gehirne wurden hierfür mit Tissue Tek™ auf dem Träger fixiert und anschließend alternierend in 20 µm oder 50 µm Dicke, koronal von anterior nach posterior geschnitten und auf Glasobjektträger (Superfrost Plus, Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) aufgezogen. Hirnschnitte für RNA-Arbeiten wurden anschließend bei 55 °C für 30 min getrocknet. Hirnschnitte für die Proteindetektion wurden bei Raumtemperatur für 1 h getrocknet. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bei -80 °C. Adulte Gehirne wurden koronal und sagittal in 30 µm Dicke am Mikrotom (SM2000R, Leica, Germany) hergestellt und in PBS bei 4°C gelagert.



#### 4.2.4. Anfertigung organotypischer Hirnschnitte

Zur Herstellung von organotypischen Lebendhirnschnitten wurden die präparierten embryonalen Gehirne in 4% *Low Melt*-Agarose (Sigma-Aldrich, Deutschland) in PBS (pH 7,4) eingebettet. Diese wurde zuvor aufgekocht und 15 min im Wasserbad bei 37 °C temperiert. Es folgte die Anfertigung von 300 µm dicken, koronalen Schnitten am Vibratom (VT1000S, Leica, Germany). Die Hirnschnitte wurden bei 4 °C in *Postholding* Puffer (Krebspuffer, 10 mM HEPES, 100 U/ml Pen, 100 U/ml Strep) gesammelt.

#### 4.2.5. Zeitrafferaufnahmen an organotypischen Hirnschnitten

Zur Detektion der Migration von tdTomato-positiven Zellen des *Dnmt1* Wildtypen und Knockouts wurden die angefertigten, organotypischen Gehirnschnitte initial 1 h in MEM $\alpha$ -Medium mit 10 % FBS, 100 U/ml Pen, 100 µg/ml Strep und 0.5% D-Glucose bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> in einer humiden Atmosphäre kultiviert. Anschließend wurden in Kulturschalen mit einer mit 2 mg/ml Collagen (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) beschichteten *Petripem* in Neurobasal-Medium (Invitrogen, U.S.A.) mit 25 mM HEPES, 2% B27 Supplement (Invitrogen, U.S.A.), 100 U/ml Pen, 100 µg/ml Strep und 0.5% D-Glucose überführt und in einer Kammer bei 37°C kultiviert. Hierbei wurde mit dem invertierten Axio Cellobserver Z1 Fluoreszenzmikroskope mit Apotome (Zeiss, Germany) während 15 h Kultivierungsdauer jede 12 min eine Aufnahme eines festgelegten Bereichs im basalen Telenzephalon getätigt. Für weitere Analysen der Verteilung und Morphologie von *Dnmt1* WT- und KO-Zellen wurden die Hirnschnitte nach Abschluss der Aufnahmen für 30 min in 4% PFA in PBS (pH 7,4) fixiert und anschließend auf Objektträger in Mowiol (Roth, Germany) eingebettet.

#### 4.2.6. Präparation von dissoziierten Einzelzellen

Für eine Vielzahl von Untersuchungen zu morphologischen Parametern, dem Zelltod und der Expression von Proteinen wurden an E15 und E16 aus organotypischen Lebendhirnschnitten spezifische Areale präpariert und auf Eis in Hank's balanced salt solution (HBSS w/o Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>; Invitrogen, Germany) mit 0.65% D-Glucose gesammelt. Anschließend erfolgte eine Dissoziation des Gewebes mit 0.4% Trypsin in HBSS für 15 min bei 37 °C, welche durch Austauschs

des Medium zu DMEM/F12 mit 10% FBS, 100 U/ml Pen und 100 µg/ml Strep gestoppt wurde. Es folgte ein Waschschrift in HBSS mit 0,65% D-Glucose, die mechanische Dissoziation mit Hilfe einer verengten Pasteurpipette und die Filterung der Zellsuspension durch ein Nylon-Netz (180 µm, Merck Millipore, Germany). Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Kammer ermittelt.

Für Kultivierungszwecke wurden circa 260 Zellen/mm<sup>2</sup> in DMEM/F12 mit 10% FBS, 100 U/ml Pen und 100 µg/ml Strep auf Laminin (19 µg/ml, Sigma-Aldrich, Deutschland)- und Poly-L-Lysine (5 g/ml, Sigma-Aldrich, Deutschland)-beschichtete Deckgläschen kultiviert. Für FACS-Anreicherungen wurden die Zellen nach der Ermittlung der Zellzahl in HBSS mit 0,65% D-Glucose belassen und 10 % FBS zugesetzt.

#### 4.2.7. siRNA- und Plasmid-Transfektion

Die Transfektion von kultivierten primären POA- und MGE-Zellen, sowie von immortalisierten N2a-Zellen erfolgte durch Lipofektion mit Lipofectamin 2000 (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) entsprechend den Herstellerangaben und wie in Pensold et al. (2016) beschrieben. Die Zellen wurden mit 50 nM Kontrol siRNA (BLOCK-iT Alexa Fluor red or green, 465318; Invitrogen, U.S.A.) und *Dnmt1* siRNA (sc-35203, Santa Cruz Biotechnology), *Pak6* siRNA (sc-44879, Santa Cruz Biotechnology) oder *Lhx1* siRNA (sc-38709, Santa Cruz Biotechnology) für 5 h in Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Opti-MEM I RSM, Thermo Fisher Scientific) transfiziert.

Die Transfektion des *Pak6*-GFP (MG216829, Origene, U.S.A.) und des Kontrol-GFP Expressionskonstrukt (pcMV-EGFP, Addgene, U.K.) erfolgte durch Zugabe von 1 µg DNA pro ml Transfektionsansatz für 5 h in Opti-MEM I RSM.

Die Zellen wurden nach der Transfektion in DMEM/F12 mit 10% FBS, 100 U/ml Pen und 100 µg/ml Strep über 24 h kultiviert, anschließend mit temperiertem PBS (pH 7,4) gewaschen und mit 4% PFA für 10 min fixiert. Nach der Fixierung wurden sie in PBS (pH 7,4) bei 4 °C bis zur Weiterverwendung gelagert.

Für die Bestimmung der Effektivitäten der siRNAs wurden transfizierte Zellen nach 24 h Kultivierung in Trizol®Reagent (Life Technologies, U.S.A.) bei -80 °C eingefroren und bis zur Weiterverwendung gelagert.

#### **4.2.8. Kultivierung mit dem DNMT-Inhibitor RG108**

Zur Detektion von methylierungsspezifischen Effekten wurden kultivierte N2a-Zellen über 24 h mit 50 nM RG108 (N-Phthalyl-L-Tryptophan; Sigma-Aldrich, Deutschland) inkubiert. Kontrollzellen wurden mit der entsprechenden Menge an DMSO kultiviert, da RG108 in diesem gelöst vorlag. Im Anschluss wurden die Zellen in Trizol®Reagent (Life Technologies, U.S.A.) für RNA-Analysen bei -80 °C gelagert.

#### **4.2.9. FACS-Anreicherung von tdTomato-positiven Zellen**

Für die Anreicherung von *Dnmt1* WT und KO-Zellen wurden an E16 das basale Telenzephalon und an P0 der Kortex präpariert. Anschließend erfolgte in Kooperation mit der *Core Facility Flow Cytometry* (FACS) am Fritz-Lipmann-Institut (FLI) Jena (Deutschland) die Sortierung der Zellen mit dem ARIA III FACS Sorter (BD Biosciences, U.S.A.). Entsprechend den in Pensold et al. (2016) detailliert beschriebenen technischen Bedingungen wurden vitale tdTomato-exprimierende Zellen in DMEM/F12, 10 % FBS, 100 U/ml Pen, 100 g/ml Strep bei 4 °C gesammelt und durch Zentrifugation pelletiert. Das Zellpellet wurde zur Hälfte in Trizol®Reagent (Life Technologies, U.S.A.) für die RNA-Isolation und zur Hälfte ohne Zusätze zur Analyse von DNA direkt eingefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

### **4.3. Molekularbiologische Methoden**

#### **4.3.1. Isolation von RNA und DNA**

Die RNA-Isolation der in Trizol®Reagent (Life Technologies, U.S.A.) befindlichen Zellen wurde standardmäßig nach Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mit RNase-freier DNase (Qiagen, Niederlande) behandelt und auf ihre Integrität mittels Gelelektrophorese überprüft (Bioanalyzer, Agilent Technologies, Inc., U.S.A.). FACS-angereicherten Zellen wurden 0,2% GlycoBlue (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) während der RNA-Aufreinigung zur Visualisierung zugegeben und nach Herstellerangaben (Trizol®Reagent, Life Technologies, U.S.A.) entsprechend prozessiert.

Die DNA Isolation von FACS-angereicherten tdTomato Zellen wurden mittels QIAamp DNA Micro Kit (Quiagen, Germany) nach Herstellerangaben durchgeführt

und ihre Integrität mittels Gelelektrophorese geprüft (Bioanalyzer, Agilent Technologies, Inc., U.S.A.).

Die Reinheit und die Konzentration der präparierten RNA und DNA wurden wenn möglich zusätzlich über die photometrische Messung der optischen Dichte mit Hilfe des NanoDrop™1000 (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) analysiert.

#### **4.3.2. Immunopräzipitation methylierter DNA (MeDIP)**

Für die Genom-weite Analyse von Veränderungen der DNA-Methylierungsmuster wurde die Immunpräzipitation von DNA-Proben FAC-sortierter, embryonaler *Dnmt1* WT und KO-Zellen zur Anreicherung von 5-Methylcytosinen verwendet. Die Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit dem *Transcriptome and Genome Analysis Laboratory* (TAL) des Universitätsklinikum Göttingen (Deutschland) durchgeführt.

Als Startmaterial wurden 100 ng genomische DNA verwendet und mittels MeDIP Kit von Zymo Research (Cat. N° D5101; U.S.A.) entsprechend der Herstellerangaben prozessiert. Anschließend wurden Illumina-kompatible Bibliotheken über das TruSeq Nano DNA Library Prep Kit (Illumina, Cat. N° FC-121-4001, U.S.A.) erstellt und mittels HiSeq 2000 (Illumina, U.S.A) analysiert. Über Illumina CASAVA wurden die Proben demultiplext und deren Qualität mittels FASTQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) kontrolliert.

Die Ergebnisse der Sequenzierungen wurden mit dem Genom von *Mus musculus* (mm10) über Bowtie 2 (versions 2.0.2) durch Verwendung von Standardparametern verglichen. Differenziell methylierte Regionen wurden mittels *MEDIPS* in *R* (version 1.16.0; Lienhard et al., 2014). Hierfür wurde eine Einteilung in 700 bp und eine minimale Abdeckung von 5% der eingeteilten Bereiche als Parameter eingesetzt. Die detaillierte bioinformatische Analyse wurde vom TAL Göttingen nach Halder et al. (2016) durchgeführt.

#### **4.3.3. Next Generation Sequencing**

Zur Detektion der differentiellen Expression wurde die RNA von FACS-angereicherten *Dnmt1* wildtypischen und Knockout-Zellen wie in 4.3.1 beschrieben isoliert und am *Transcriptome and Genome Analysis Laboratory* (TAL) in Göttingen mittels *Next Generation Sequencing* untersucht. Die Bearbeitung und Auswertung erfolgte wie in Pensold et al. (2016) beschrieben.

#### 4.3.4. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Zur Analyse von Unterschieden in der Assoziation von H3K27me3 mit spezifischen Genbereichen wurden Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) durchgeführt.

Dafür wurden N2a-Zellen nach ihrer Kultivierung mit Formaldehyd (1% final) quervernetzt. Die Zugabe von 0.125 M Glycin beendete die Reaktion und die Proben wurden anschließend bei 4 °C in PBS (pH 7,4) mit Protease-Inhibitoren (1 mM PMSF, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Pepstatin A; Serva, Deutschland) gewaschen und bei -80 °C gelagert.

Das Startmaterial für jedes ChIP-Experiment waren circa  $1 \times 10^6$  Zellen. Diese wurden in 400 µl SDS Lyse-Puffer (50 mM Tris-HCl [pH 8,1], 10 mM EDTA [pH 8,0], 1% SDS) mit Protease-Inhibitoren (1 mM PMSF, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Pepstatin A; Serva, Deutschland) resuspendiert und 10 min bei 4 °C lysiert.

Die Fragmentierung der DNA erfolgte in 30 Zyklen mit je 30 s Pause zwischen jedem Zyklus im Ultraschallwasserbad (Sonorex super 10P, Bandelin, Deutschland) bei 4 °C und einer Leistung von 100 %. Nach jedem 10. Zyklus wurden die Proben 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (10 min, 13.000 rcf, 4°C) wurde der Überstand 10fach mit *ChIP Dilution*-Puffer (16,7 mM Tris-HCl [pH 8,1], 167 mM NaCl, 1,2 mM EDTA [pH 8,0], 1,1% Triton X-100, 0,01% SDS) mit Protease-Inhibitoren (1 mM PMSF, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Pepstatin A; Serva, Deutschland) verdünnt und 1 % dieser Probe als Input-Kontrolle abgenommen. Je 100 µl Probe wurden anschließend 3 µl *Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA* (50% wässrig; Millipore, Deutschland) hinzugegeben und 30 min unter Rotation bei 4 °C inkubiert.

Nach der Zentrifugation (1 min, 1.000 rcf, 4°C) wurde der Überstand mit 4 µg/ml Antikörper 12 h unter Rotation bei 4 °C inkubiert. Es wurden folgende Antikörper in separaten Reaktionen verwendet: *rabbit*-anti-H3K27me3 (Millipore, Deutschland), *Normal-rabbit*-IgG (Millipore, Deutschland). Dabei wurde der *Normal-rabbit*-IgG zur Ermittlung der durch IgG unspezifisch, gebundenen DNA-Menge verwendet.

Zur Präzipitation der durch den Antikörper gebundenen DNA-Protein-Komplexe wurden pro 100 µl Probe mit je 3 µl *Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA* (50% wässrig; Millipore, Deutschland) 1 h unter Rotation bei 4 °C inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert (1 min, 1.000 rcf, 4°C) und nacheinander je 5 min mit folgenden Puffern rotierend gewaschen: *Low Salt Immune Complex*-Waschpuffer

(20 mM Tris-HCl [pH 8,1], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA [pH 8,0], 1% Triton X-100, 0,1% SDS), *High Salt Immune Complex*-Waschpuffer (20 mM Tris-HCl [pH 8,1], 500 mM NaCl, 2 mM EDTA [pH 8,0], 1% Triton X-100, 0,1% SDS), LiCl Immune Complex-Waschpuffer (16,7 mM Tris-HCl [pH 8,1], 250 mM LiCl, 1 mM EDTA [pH 8,0], 1% Natriumdesoxycholat, 1% IGEPAL CA630), 2x TE Buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8,1], 1 mM EDTA [pH 8,0]). Nach erneuter Zentrifugation (1 min, 1.000 rcf, 4°C) wurden zur pelletierten Agarose 250 µl frisch präparierter Elutionspuffer (1% SDS, 0,1M NaHCO<sub>3</sub>) hinzugegeben und 15 min bei Raumtemperatur rotierend inkubiert. Nach der Zentrifugation (1 min, 1.000 rcf, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Elution mit der verbleibenden Agarose wiederholt um ein finales Volumen von 500 µl Eluat zu erhalten.

Im Anschluss an die Elution wurden die DNA-Protein-Quervernetzungen unter Zugabe von 20 µl 5M NaCl über 4 h bei 65 °C entfernt. Dies wurde auch mit der zuvor abgenommenen Input-Probe nach Verdünnen auf final 500 µl mit Elutionspuffer (1% SDS, 0,1M NaHCO<sub>3</sub>) zeitgleich durchgeführt. Es folgte der Proteinverdau unter Zugabe von 10 µl 0,5M EDTA, 20 µl 1M Tris-HCl (pH 6,5) und 1,43 µl Proteinase K (14 mg/ml) für 1 h bei 45 °C.

Abschließend wurde die Anreicherung und Aufreinigung der DNA durchgeführt. Nach Zugabe von 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zur Probe erfolgte eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur. Nach der Zentrifugation (45 min, 14.000 rcf, 4°C) erfolgte die weitere Aufreinigung entsprechend den Herstellerangaben des Zymo Research *DNA Clean & Concentrator-5* Kits (U.S.A.). Die Proben wurden in 30 µl DNase-freiem Wasser eluiert und bei -80 °C gelagert.

#### **4.3.5. Amplifikation und Analysen durch Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)**

Die PCRs wurden an folgenden Maschinen durchgeführt:

- T-Gradienten PCR Maschine (Bio-rad, U.S.A.) oder T3000 Thermocycler (Biometra, Deutschland) für jegliche Standard-Amplifikationen
- CFX96 qPCR System (Bio-rad, U.S.A.) für die quantitative Expressionsanalysen
- Real-Time PCR-System qTOWER<sup>3</sup>/R (Analytik Jena, Deutschland) für die quantitative Analyse von ChIP-Proben

Bei Notwendigkeit wurden die PCR-Produkte per Gelelektrophorese im 2% Agarosegel separiert und die Fragmentgrößen mittels DNA-Standard (Ares Bioscience, Deutschland) und mit Hilfe des Transiluminators Visi-Doc-It™ Imaging Systems (UVP, Deutschland) analysiert.

#### 4.3.5.1. Genotypisierung und Standard-PCR

Genotypisierungen wurden an DNA durchgeführt, welche durch alkalische Lyse (25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA) der entsprechenden Schwanzbiopsien für 45 min bei 95 °C und anschließender Neutralisierung (40 mM Tris-HCl) gewonnen wurde. Die PCR wurde mit einem Volumen von 20 µ und einer eingesetzten DNA-Menge zwischen 0,1-1 µg entsprechend der Herstellerangaben der verwendeten Taq DNA Polymerase (1,5 U, Invitrogen, U.S.A.) mit 10 pmol jedes Primer und 0,5 mM von jedem dNTP durchgeführt. Die verwendeten Primer und PCR-Programme sind nachfolgend in Tabelle 1-4 aufgeführt:

##### **Genotypisierung von *Dnmt1 loxP<sup>2</sup>* Stellen:**

PCR Programm:		Primer:	
┐	95°C, 30s	<i>Dnmt1</i> F:	GGGCCAGTTGTGTGACTTGG
37 x	58°C, 25s	<i>Dnmt1</i> R:	CCTGGGCCTGGATCTTGGGGA
└	72°C, 30s		
	72°C, 2 min	Fragmentgrößen:	
	4°C, ∞	Wildtyp:	334 bp
		<i>Dnmt1 loxP<sup>2</sup></i> :	368 bp

**Tabelle 1: Genotypisierung von *Dnmt1 loxP<sup>2</sup>* Stellen.** Primer sind in 5'-3' Richtung angegeben. F, Fortwärtsprimer, R, Rückwärtsprimer.

##### **Genotypisierung von *Lhx1 loxP<sup>2</sup>* Stellen:**

PCR Programm:		Primer:	
┐	95°C, 30s	<i>Lhx1</i> F:	ATCCAAATCCGCCTCACAGTAG
35 x	65°C, 25s	<i>Lhx1</i> R:	CAAAAACAAATCAAAAACCCAGAG
└	72°C, 45s		
	72°C, 10 min	Fragmentgrößen:	
	4°C, ∞	Wildtyp:	451 bp
		<i>Lhx1 loxP<sup>2</sup></i> :	551 bp

**Tabelle 2: Genotypisierung von *Lhx1 loxP<sup>2</sup>* Stellen.** Primer sind in 5'-3' Richtung angegeben. F, Fortwärtsprimer, R, Rückwärtsprimer

**Genotypisierung von *tdTomato*:**

PCR Programm:		Primer:	
┐	95°C, 30s	oIMR9020-wt-F:	AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA
37 x	61°C, 30s	oIMR9021-wt-R:	CCGAAAATCTGTGGGAAGTC
└	72°C, 1 min	oIMR9103-mu-R:	GGCATTAAAGCAGCGTATCC
	72°C, 2 min	oIMR9105-mu-F:	CTGTTCTGTACGGCATGG
	4°C, ∞		
Fragmentgrößen:			
		Wildtyp:	297 bp
		Mutante	196 bp

**Tabelle 3: Genotypisierung von *tdTomato* Stellen.** Primer sind in 5'-3' Richtung angegeben. F, Fortwärtsprimer, R, Rückwärtsprimer.

**Genotypisierung von *Hmx3-Cre* Stellen:**

PCR Programm:		Primer:	
	94°C, 5 min	<i>iCre</i> F:	CTCTGACAGATGCCAGGACA
┐	94°C, 30s	<i>iCre</i> R:	TCTCTGCCCAGAGTCATCCT
	67°C, 30s, -0,5°+0:00	<i>Ano6</i> F:	CTGGTAAACGTGGAAGAGCAC
9 x	R=3,0°/s+0:00°/s	<i>Ano6</i> R:	GCTTTATGCCACCCCTTACAG
	G=0,0 °C		
└	72°C, 30s	Fragmentgrößen:	
┐	94°C, 30s	<i>Cre</i>	394 bp
25 x	62°C,30s	<i>Ano6</i>	198 bp
└	72°C, 30s		
	72°C, 5min		
	4°C, ∞		

**Tabelle 4: Genotypisierung von *Cre* und *Ano6* Stellen.** Primer sind in 5'-3' Richtung angegeben. *Ano6* wurde als interne Positivkontrolle der PCR verwendet. F, Fortwärtsprimer, R, Rückwärtsprimer.

#### 4.3.5.2. Expressionsanalysen und siRNA-Validierung mittels quantitativer PCR

RNA-Expressionsanalysen wurden mittels einer Einschritt-qPCR-Reaktion unter Verwendung des SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, U.S.A.) entsprechend den Herstellerangaben bei 60 °C am CFX96 qPCR System (Bio-rad, U.S.A.) durchgeführt. Die Primereffektivitäten wurden mit



Temperaturgradienten-qPCR und RNA-Konzentrationsreihen zuvor validiert und in die nachfolgende Kalkulationen mit einbezogen. Alle erhaltenen Werte der qPCR Messungen wurden auf *Rps29* und *ActB* normalisiert und über die  $\Delta\Delta C_t$ -Methode analysiert. Es wurden je mindestens 3 unterschiedliche Experimente mit je 4 technischen Replikaten durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 5 aufgelistet

#### qPCR Primer

<b><i>Dnmt1</i></b>	<b>F Primer</b>	<b>TGAGCATCGATGAGGAGATG</b>	
	R Primer	CGCATGGAACATCATCTGAC	134 bp
<b><i>Pak6</i></b>	F Primer	CTGTACGCTACTGAGGTGGA	
	R Primer	GTACCAGCATCCGATCCAGG	193 bp
<b><i>Lhx1</i></b>	F Primer	GCTACACCCAAGCCCACAC	
	R Primer	GCTGTTTCATCCTTCGCTCC	121 bp
<b><i>Ezh2</i></b>	F Primer	GAGAGTGTGACCCTGACCTC	
	R Primer	ATCAGACGGTGCCAGCAG	128 bp
<b><i>Bcl2</i></b>	F Primer	ATCCAGGATAACGGAGGCTG	
	R Primer	CTGAGCAGGGTCTTCAGAG	101 bp
<b><i>Bcl6</i></b>	F Primer	GGACATCTTGACGGACGTTG	
	R Primer	CAGGAGGATGCAAAACCCCT	178 bp
<b><i>Fgfr1</i></b>	F Primer	CTCGGGGCATGGAGTATCTT	
	R Primer	GAGCTAAGCCAAAGTCTGCG	114 bp
<b><i>Unc5b</i></b>	F Primer	ACCCTTGGATCATGAGGTCC	
	R Primer	AAGTTAGTGTCTGAGCGGG	114 bp
<b><i>Ntn1</i></b>	F Primer	GCATCAAGATTCCTGTGGCG	
	R Primer	ACGGAGATGATGTTACGGT	208 bp
<b><i>Rps26</i></b>	F Primer	GAAGTTCGGCCAGGGTTCC	
	R Primer	GAAGCCTATGTCCTTCGCGT	121 bp
<b><i>bAct</i></b>	F Primer	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	
	R Primer	CAATAGTGATGACCTGGCCGT	138 bp

**Tabelle 5: Verwendete Primer für die qPCR.** Primer sind in 5'-3' Richtung angegeben. Die Fragmentgröße der entsprechenden Produkte ist angegeben. F, Fortwärtsprimer, R, Rückwärtsprimer.

Die Validierung der Effektivitäten der verwendeten siRNA's wurde mittels qPCR an RNA-Proben von kultivierten N2a-Zellen, wie vorangehend beschrieben (siehe 4.2.7), überprüft und sind in Tabelle 6 dargestellt.

#### relative Expressionsreduktion zur Kontroll-siRNA

<b>Dnmt1 siRNA</b>	67,54 ± 13,77%	p = 1,27855E-05; ***
<b>Pak6 siRNA</b>	67,19 ± 8,94%	p = 2,68096E-06; ***
<b>Lhx1 siRNA</b>	52,75 ± 13,7%	p = 0,004138857; **

**Tabelle 6: Effektivitäten der verwendeten synthetischen siRNA's.** Zur Bestimmung der Expressionsreduktion wurden die auf *Rps29* und *bAct* normalisierten qPCR Werte in Relation zu den Werten von Kontroll-siRNA-behandelten Zellen gesetzt. Die Ermittlung der Expression wurde jeweils in 3 unterschiedlichen Experimenten durchgeführt. Zur Ermittlung der Signifikanz wurde ein Studentischer t-Test durchgeführt mit \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

#### 4.3.5.3. Voramplifikation und qPCR von ChIP-DNA-Proben

Der quantitativen Messung der mittels ChIP erhaltenen DNA-Proben vorrausgehend, wurde eine Voramplifikation (Tab. 7) mit den entsprechenden Primern (Tab. 8) mit dem nach Herstellerangaben verwendeten innuMIX qPCR MasterMix SyGreen qPCR Kit (Analytik Jena, Deutschland) durchgeführt. Die Primer-spezifische Voramplifikation wurde in einer PCR-Reaktion mit den relevanten Proben, der Input-Kontrolle und der IgG-Kontrolle gleichzeitig durchgeführt. Hierfür wurden in 15 µl Reaktionsansätzen je 2 µl DNA eingesetzt und an der T-Gradienten PCR Maschine (Bio-rad, U.S.A.) amplifiziert.

#### Voramplifikation ChIP-DNA-Proben:

##### PCR Programm:

┐ 95°C, 25s

20 x

└ 60°C, 40s

4°C, ∞

**Tabelle 7: Voramplifikation der ChIP-DNA-Proben.** Die PCR wurde mit spezifischen Primern (Tabelle 8) durchgeführt unter Verwendung des innuMIX qPCR MasterMix SyGreen (Analytik Jena, Deutschland) an der T-Gradienten PCR Maschine (Bio-rad, U.S.A.) durchgeführt.

Im Anschluss erfolgte aufgrund von zügigen Degradationseffekten die sofortige quantitative Expressionsanalyse am *Real-Time* PCR-System qTOWER<sup>3</sup>/G (Analytik Jena, Deutschland). Hierfür wurden 2 µl der Voramplifikation mit 3 µl entsprechend

den Herstellerangaben zubereiteten, primer-spezifischen innuMIX qPCR MasterMix SyGreen (Analytik Jena, Deutschland) versetzt und wie in Tabelle 9 dargestellt amplifiziert.

<b>qPCR DNA-Primer</b>			
<b>Pak6 #1</b>	F Primer	TCTCACTCTCAGAAGCCAGG	
	R Primer	AGCGTAGATCAGAGTGGGTG	129 bp
<b>Pak6 #2</b>	F Primer	ACACTGTGCTTCTCCCTAGG	
	R Primer	TTCTCTCCGCTCCTTTCTCC	114 bp
<b>Pak6 #3</b>	F Primer	CGCTGCTGAAGTTCTTCTGG	
	R Primer	GGCCCTTCTTACCGTCAGAT	81 bp
<b>Lhx1 #1</b>	F Primer	AGACCTCTGATCCGAAGCTG	
	R Primer	AACGACTTCTTCCGGTGAGT	89 bp
<b>Lhx1 #2</b>	F Primer	GCCCCAATCATTTCTTCCCC	
	R Primer	ACCCTGGTTTGTCACTCTGT	111 bp
<b>Lhx1 #3</b>	F Primer	GGCAACTGTCTGAATATCATGGT	
	R Primer	TGACAGATTTGCAGGGCTTG	97 bp

**Tabelle 8: Primer für die qPCR von ChIP-DNA-Proben** Primer sind in 5'-3' Richtung angegeben. Die Fragmentgröße der entsprechenden Produkte ist angegeben. F, Fortwärtsprimer, R, Rückwärtsprimer.

Die Primereffektivitäten wurden mit Temperaturgradienten-qPCR und RNA-Konzentrationsreihen zuvor validiert. Es wurde mittels  $\Delta\Delta C_t$ -Methode analysiert. Die Normalisierung der Werte für spezifische Primerpositionen erfolgte in Relation zu den detektierten Input-Werten (Percent Input Methode, (Haring et al., 2007)) Die entsprechenden Werte der IgG-Kontrolle dienen zur Visualisierung der Antikörper-bedingten, unspezifischen DNA-Detektion (Haring et al., 2007).

#### **qPCR ChIP-DNA-Proben:**

##### **PCR Programm:**

┐ 95°C, 5s  
40 x  
└ 60°C, 20s  
4°C, ∞

**Tabelle 9: Quantitative PCR zur Bestimmung des DNA Gehalts nach ChIP.** Die PCR wurde mit entsprechenden Primern und unter Verwendung des innuMIX qPCR MasterMix SyGreen (Analytik Jena, Deutschland) am Real-Time PCR-System qTOWER3/G (Analytik Jena, Deutschland) durchgeführt.

#### 4.3.6. *In situ* Hybridisierung zur Detektion von mRNA

Die Herstellung von RNA-Sonden wurde in zwei Schritten durchgeführt:

- Synthetisierung der entsprechenden Sonden-cDNA-Sequenz mittels Polymerase-Kettenreaktion
- Vervielfältigung der Sequenz per *in vitro* Transkription

Die Synthetisierung erfolgte mittels Standard-PCR entsprechend den Herstellerangaben mit 1,5 U *HotStart* Taq-DNA Polymerase (Genaxxon bioscience, Germany) und 20 µmol jedes Primers (*Lhx1* F: 5'-GAGCTCCAGTGTGCGCCAAAGAGAACA-3'; *Lhx1* R: 5'-GATGCTGAAGAAGG GCGTTCCCATGG-3'). Es wurde das in Tabelle 7 illustrierte Amplifikationsprogramm verwendet. Initial erfolgte jedoch eine Aktivierung der Taq-Polymerase für 5 min bei 95°C. Es folgte eine Standard-RNA-Präzipitation und Aufreinigung mit 0,6 M Natriumacetat und Ethanol (Rio et al., 2010). Die synthetisierte Fragmentgröße wurde mittels Gelelektrophorese überprüft.

Die Primersequenzen enthalten Restriktionsstellen für *SacI* (5'-GAGAGCTC-3') und *KpnI* (5'-CCATGG-3'), welche für die Klonierung der cDNA-Sequenz in die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors pBluescript II sk (-) benötigt werden. Hierfür wurden 3 µl der Plasmid- bzw. Insert-DNA in getrennten Reaktionsgefäßen mit jeweils 1 U der beiden fastDigest® Restriktionsenzyme *SacI* und *KpnI* (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) für 2 h bei 37 °C verdaut. Im Fall des Plasmids wurde für die Dephosphorylierung 1 U Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP, Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) hinzugegeben um eine Religation zu unterbinden. Anschließend erfolgt die Ligation des linearen Plasmidstranges mit der Insert-Sequenz Verhältnis 1:5 mit 1 U Ligase (Invitrogen, U.S.A) für 30 min bei Raumtemperatur. Die Transformation von *E. coli* DH5α erfolgte mit 8 ng ligierter Plasmid-Insert-DNA durch Hitzschock bei 42 °C für 30 s. Nach selektiver Kultivierung (50 µg/ml Ampicillin) wurden die Klone mittels Standard-PCR und Gelelektrophorese auf die korrekte Insertgröße überprüft. Das Plasmid positiver Klone wurde mittels NucleoSpin® Plasmid MiniPrep Kit (Macherey&Nagel, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben angereichert und aufgereinigt.

Die *In vitro* Transkription der *antisense* Sonde erfolgte nach der Linearisierung des Plasmids durch Restriktion mit 1 U *SacI* für 2 h bei 37 °C und Glättung der Schnittstellen mit 3 U T4-DNA-Polymerase (Invitrogen, U.S.A) und je 100 µM dNTP

bei für 20 min bei 12 °C. Dabei wurde zur Synthese der Antisense-Sonde die T3 RNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) verwendet, welche eine Bindungsstelle im Plasmid besitzt. Die Reaktion wurde in einem Ansatz aus 1 µg linearisierter Plasmid-Insert-DNA, 20 U RiboLock™ RNase-Inhibitor (Invitrogen, U.S.A), 0,5 mM Digoxigenin-markierte dNTPs (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) und 40 U RNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) für 2 h bei 37 °C durchgeführt. Anschließend wurde die Reaktion mit 0,05 M EDTA (pH 8) gestoppt und mittels 1 M LiCl und Ethanolfällung aufgereinigt (Rio et al., 2010) Die RNA-Sonde wurde bei -80 °C gelagert.

Die Detektion der RNA in Gewebeschnitten mit Digoxigenin-markierten RNA-Sonden umfasst folgende Schritte, die ausführlich in Zimmer et al. (2011) beschrieben sind und entsprechend durchgeführt wurden:

- Nachfixierung und Umpufferung des Gewebes
- Hybridisierung mit der RNA-Sonde
- Detektion der Hybridisierung

Die Hybridisierung mit der RNA-Sonde wurde bei 75 °C über 24 h durchgeführt. Die Visualisierung der detektierten RNA erfolgte über die Farbsubstratsatzreaktion der alkalischer Phosphatase (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) von je 0,4 mM Nitroblau-Tetrazoliumblau (NBT) und 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) über 48 h Inkubation unter Ausschluss von Licht.

#### **4.3.7. Immunfluoreszenzmarkierung an adulten Gehirnschnitten und kultivierten Einzelzellen**

Die Immunfluoreszenzmarkierungen adulter Gehirne wurden an koronalen, *free-floating* Hirnschnitten durchgeführt. Nach Waschen in PBS/0,2% Triton-X-100 und Antigenretrieval für 20 min bei 90 °C in 10 mM Zitratpuffer mit 0,05% Tween20 (pH 6,0) erfolgte die Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen mit 10% Normal-Ziegeserum (NGS), 4% Bovines Serumalbumin (BSA) in PBS/0,2% Triton X-100 für 1 h. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über 48 h in Blockierungslösung bei 4 °C. Nach anschließendem Waschen in PBS/0,2% Triton-X-100 wurde die Inkubation mit dem Sekundärantikörper über 5 h in Blockierungslösung bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach der Kernfärbung

mit DAPI (100 ng/ml in PBS; Molecular Probes, U.S.A.) für 10 min wurden die Schnitte in Mowiol eingebettet.

Für die Immunfluoreszenzfärbung an kultivierten Einzelzellen erfolgte ein verkürztes Protokoll mit der primären Antikörperinkubation für 3 h, der sekundären Antikörperinkubation für 1 h und DAPI für 5 min. Dabei wurden stets PBS/0,1% Triton-X-100 verwendet und auf ein Antigenretrieval verzichtet.

Folgenden primären Antikörper wurden verwendet: anti-TUBB3 (Sigma, Deutschland, 1:500). anti-H3K27me3 (Millipore, Deutschland, 1:300); anti-Ctip2 (Abcam, U.K., 1:300), Cux2 (Santa Cruz, USA, 1:200). Folgende Sekundärantikörper wurden eingesetzt: *goat* Alexa488 anti-*rabbit* (Thermo Fisher Scientific, U.S.A., 1:1000), *goat* Cy5 anti-*rat* (Invitrogen, U.S.A., 1:1000).

#### **4.3.8. TUNEL-Apoptose Assay**

Zur Detektion von Zelltod in kultivierten Einzelzellen und an P0 Gefrierschnitten wurde die TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) mittels dem ApopTag Fluorescein *In situ* Apoptosis Detection kit (Millipore, Germany) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

#### **4.4. Mikroskopie, Datenauswertung und Statistik**

Immunfluoreszenzfärbungen von adulten Hirnschnitten, sowie primären und immortalisierten Zellen und unbehandelte, embryonale Hirnschnitte der konditionalen Mauslinien wurden entweder mit dem invertierten, konfokalen Laserscan-Mikroskop TCS SP5 (Leica Microsystems, Germany) oder mit dem invertierten Durchlichtmikroskop Axio Cellobserver Z1 mit MosaiX Module und Apotome (Carl Zeiss Microscopy, Germany) aufgenommen. Die Visualisierung von *in situ* Hybridisierungen wurde mit dem Axio Cellobserver Z1 durchgeführt. Alle Bilder wurden mit der Fiji Software analysiert (Schindelin et al., 2012).

#### **4.4.1. Quantifizierung von Zellmorphologie und -migration**

##### **4.4.1.1. Analyse der Zellmorphologie in Gehirnschnitten und von Einzelzellen**

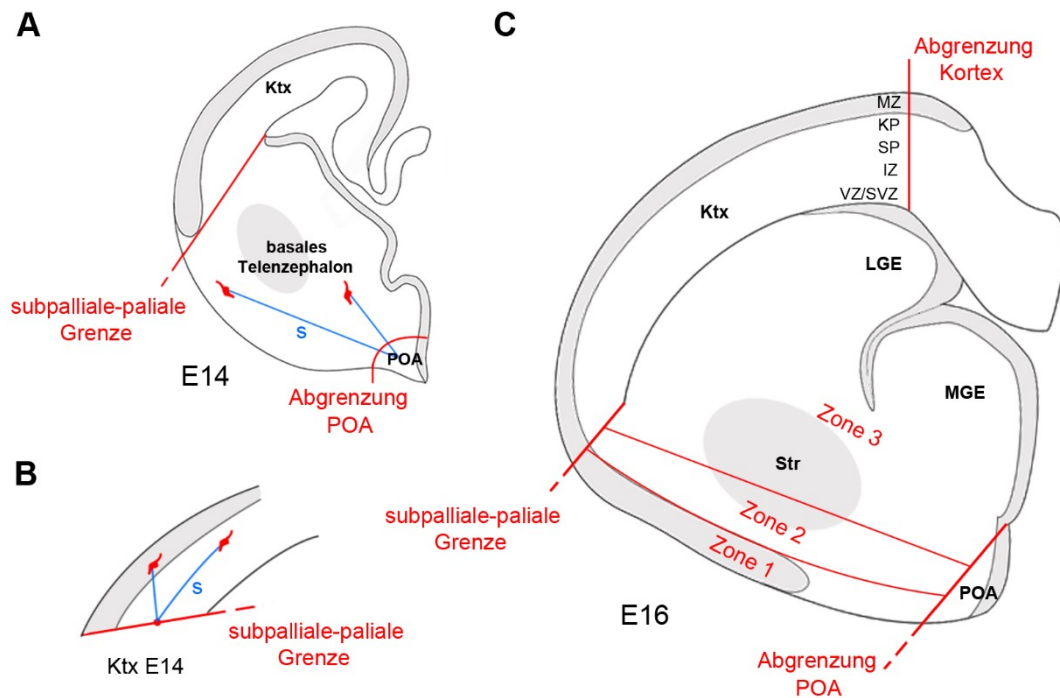
Die Morphologie der Zellen wurde in Gehirnschnitten anhand des tdTomato-Signales und in kultivierten primären und immortalisierten Einzelzellen anhand des detektierten TUBB3 Signals analysiert. Dabei wurden die Anzahl der Fortsätze vom Soma, die Länge aller Fortsätze und die Verzweigungspunkte des längsten Fortsatzes ausgewertet. Das Verhältnis der durchschnittlichen Neuritenlänge zur Länge des Führungsfortsatzes wurde bestimmt und zusammen mit der Verzweigungsrate und der Anzahl an Fortsätzen ergeben diese Daten die Komplexität einer Zelle. Die relative Komplexität benennt den Wert nach Normalisierung auf den Mittelwert der Komplexität von wildtypischen Zellen beziehungsweise Kontrollzellen.

##### **4.4.1.2. Analysen der Zellzahl und -lokalisation in Gehirnschnitten**

Zellen in adulten und embryonalen Gehirnschnitten der konditionalen Mauslinien wurden aufgrund ihrer tdTomato-Expression analysiert. Dabei wurden die Zellzahl und die Lokalisation bestimmt.

Die Kortizes adulter Tiere wurden in sagittale und koronale Hirnschnitten Bregmen-, Areal- und Schichten-spezifisch ausgewertet. Dabei wurden für Sagittalschnitte Bregmen (Interaural) zwischen 1.44 - 1.92 und für Koronalschnitte Bregmen (Interaural) zwischen 3.34 - 4.78 analysiert. Dabei wurde zwischen somatosensorischen, motorischen und visuellen Kortex, sowie den kortikalen Schichten I-VI entsprechend dem Allen Brain Referenzatlas (<http://mouse.brain-map.org/static/atlas>) unterschieden. Die Einteilungen wurden dabei anhand der DAPI-Markierung durchgeführt. Die Zellen im POA und Septum adulter Tiere wurden entsprechend am Bregma (Interaural) 0.32 für das POA beziehungsweise am Bregma (Interaural) 1.32 für das Septum ausgezählt.

Zur Bestimmung der Zellzahl und -lokalisierung in embryonalen Hirnschnitten wurden diese in die drei Bereiche POA, basales Telenzephalon und Kortex entsprechend Abbildung 1A unterteilt. Dabei wurden die Fläche des POA aufgrund der Zelldichte von tdTomato-Zellen und die subpalliale-palliale Grenze aufgrund des DAPI-Signals bestimmt. Zellzahlen wurden zu Vergleichszwecken auf die Größe der ausgewerteten Fläche normalisiert und sind als Zelldichte angegeben.



**Abbildung 6: Einteilung des embryonalen koronalen Hirnschnittes in Zonen.** (A) Zu Analyse Zwecken wurden koronalen E14 Hirnschnitte mit Hilfe von DAPI und tdTomato in POA, basales Telenzephalon (ohne POA) und Kortex eingeteilt und ausgewertet. Die Abtrennung zwischen Kortex und basalem Telenzephalon bildet die subpalliale-palliale Grenze. Das POA grenzt sich in konditionen Mäusen durch die hohe Dichte der tdTomato-positiven Zellen vom basalen Telenzephalon ab. Die Migrationsweiten (s) der subpallialen Zellen wurden vom Mittelpunkt des POA bis zum Mittelpunkt des Zellsomas gemessen. (B) Die Migrationsweiten (s) im Kortex entsprachen der direkten Strecke vom Mittelpunkt der subpallialen-pallialen Grenze bis zum Mittelpunkt des Zellsomas. (C) Das basale Telenzephalon von E16 Hirnschnitten wurde in Zone 1 und 2 (zusammengefasst SMS) und Zone 3 (Tiefer TMS) über die Ausrichtung des Schnittes und in Abhängigkeit von der lateralen äußeren Biegung des Hirnschnittes eingeteilt. Der Kortex wurde anhand der Dichte von DAPI-gefärbten Zellen in seine transienten Schichten (MZ, KP, SP, IZ und VZ/SVZ) unterteilt und ausgewertet. IZ, Intermediärzone; KP, Kortikalplatte; Ktx, Kortex; LGE, laterale ganglionische Eminenz (GE); MGE, mediale GE; MZ, Marginalzone; POA, präoptisches Areal; s, Migrationsstrecke; SMS, superfizieller Migrationsstrom; SP, Subplatte; Str, Striatum; TMS, tiefer Migrationsstrom; SVZ, Subventrikularzone; VZ, Ventrikularzone.

#### 4.4.1.3. Analyse von Migrationsweiten und -wegen in Gehirnschnitten

Eine detaillierte Analyse der zurückgelegten Migrationsweiten durch das basale Telenzephalon und den Kortex in E14 Hirnschnitten wurden durch Messung der Distanz vom Startpunkt bis zum Mittelpunkt des Zellsomas detektiert (Abb. 6A). Dabei wurde für die Migrationsweiten im basalen Telenzephalon der Mittelpunkt des POA als Startpunkt aller Zellen gewählt. Für kortikalen Zellen wurde der Mittelpunkt der subpallialen-pallialen Grenze als Startpunkt gesetzt (Abb. 6B). Dabei wurden stets direkte Wege gemessen.

Die Verteilung der Zellen im basalen Telenzephalon von E16 Tiere auf den superfiziellen und tiefen Migrationsweg (SMS, TMS) erfolgte nach Einteilung der



Hirnschnitte in entsprechende Zonen. Um eine größtmögliche Homologie zwischen unterschiedlichen Hirnschnitten zu ermöglichen wurde eine Dreiteilung des basalen Telenzephalons wie folgt durchgeführt (Abb. 6C):

- rechtwinklige Ausrichtung des POA als unterste Punkt des Bildrandes
- Abgrenzen der subpallialen-pallialen Grenzen anhand DAPI
- Bildung einer Tangenten zur subpallialen-pallialen Grenze, welche das tdTomato-signalreiche POA vom basalen Telenzephalon abgrenzt
- Dreiteilung beider abgrenzender Linien für die Einteilung der Zonen
- als Abbild der lateralen, äußeren Biegung des Hirnschnittes erfolgte die Einteilung der Zone 1
- Zonen 2 wurde mittels einer Geraden durch der mittleren Unterteilungen der Tangentialen eingeteilt und Zone 3 entsprach dem restlichen medialen Bereich

Die Zone 1 und die Zonen 2 wurden zum superfiziellen Migrationsstrom (SMS) zusammengefasst und Zone 3 spiegelt den tiefen Migratorweg (TMS) wieder.

Die Zuteilung der Zellen an E16 zu transienten Schichten im Kortex wurde mittels DAPI und der daraus ersichtlichen Zelldichte durchgeführt (Abb. 6C). Es wurden folgende Einteilung vom Ventrikel ausgehend in dorsale Richtung vorgenommen (Vitalis und Rossier, 2011): Ventrikular/Subventrikularzone (VZ/SVZ), Intermediärzone (IZ), Subplate (SP), Korkalplatte (KP) und Marginalzone (MZ).

#### 4.4.1.4. Analyse von Fluoreszenzintensitätsaufnahmen

Die Analyse der Fluoreszenzintensitäten der am Axio Cellobscerver Z1 mit MosaiX Module und Apotome (Carl Zeiss Microscopy, Germany) aufgenommenen Zellen wurde mittels Fiji Software durchgeführt (Schindelin et al., 2012). Die Normalisierung der im Zellsoma gemessenen, durchschnittlichen Fluoreszenzintensität erfolgte gegen die durchschnittliche Hintergrundintensität im umgebenen Bildbereich.

#### **4.4.2. Statistik**

Die Anzahl der auswerteten Hemisphären und Zellen ist durch „n“ angegeben und stets in der entsprechenden Abbildungslegende konkretisiert. Die Auswertung der embryonalen und adulten murinen Gehirne erfolgte an mindestens drei nicht direkt verwandten Tieren. Es wurden, wenn nicht anders angegeben, je drei individuelle Experimente durchgeführt und zusammengefasst.

Der Studentsche t-Test wurde zur Berechnung der statistischen Varianzen verwendet. Der Fisher Exakt-Test wurde für die statistische Auswertung der Analyse der Genontologischen Anreicherung verwendet. In beiden Tests spiegelt „p“ das Signifikanzlevel wieder (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

## 5. Ergebnisse

Die große Vielfalt neuronaler Subtypen und deren korrekte Verschaltung bedarf einer strikten zeitlichen und zelltyp-spezifischen Regulation im Hinblick auf die Expression von Genen, welche distinkte Entwicklungsprogramme und die Funktionalität einzelner Zellgruppen bedingen.

Der Regulation durch Transkriptionsfaktoren und Koregulatoren übergeordnet, stehen epigenetische Mechanismen mehr als je zuvor im Mittelpunkt der aktuellen Forschung (Kim et al., 2009; Murrell et al., 2013; Cholewa-Waclaw et al., 2016). Hierbei gilt neben der Regulierung durch RNA Derivate, sowie der Modifizierung von Aminosäuren an Histonproteinen, insbesondere die DNA Methylierung als essentieller Part eines komplexen Regulationsnetzwerks (Chuang und Jones, 2007; Zhang und Pradhan, 2014). Zusätzlich zu ihrer Funktion in der Methylierung von hemimethylierter DNA in sich teilenden Zellen, wurde die DNA Methyltransferase 1 (DNMT1) ebenfalls in postmitotischen exzitatorischen Neuronen detektiert (Fan et al., 2005; Hutnick et al., 2009; Rhee et al., 2012).

Welche Rolle DNMT1 bei der postmitotischen Entwicklung unreifer kortikaler Interneurone hat, ist weitestgehend unbekannt. Daher war die Aufklärung der Funktionen von DNMT1 bei der Regulation von entwicklungsrelevanten Prozessen unreifer Interneurone ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit.

Zu entscheidenden Entwicklungsprozessen zählen hierbei die Migration in entsprechende Zielareale, die Differenzierung in bestimmte Subtypen und das Überleben während des gesamten Entwicklungszeitraumes (Wamsley und Fishell, 2017). Diese Prozesse werden oft durch spezifische Transkriptionsfaktoren reguliert. Welche potenzielle Funktionen hierbei der LIM-HD-Transkriptionsfaktor LHX1 hat und inwieweit er der Expressionskontrolle von DNMT1 unterliegt, sollten Untersuchungen im zweiten Teil der Arbeit herausstellen.

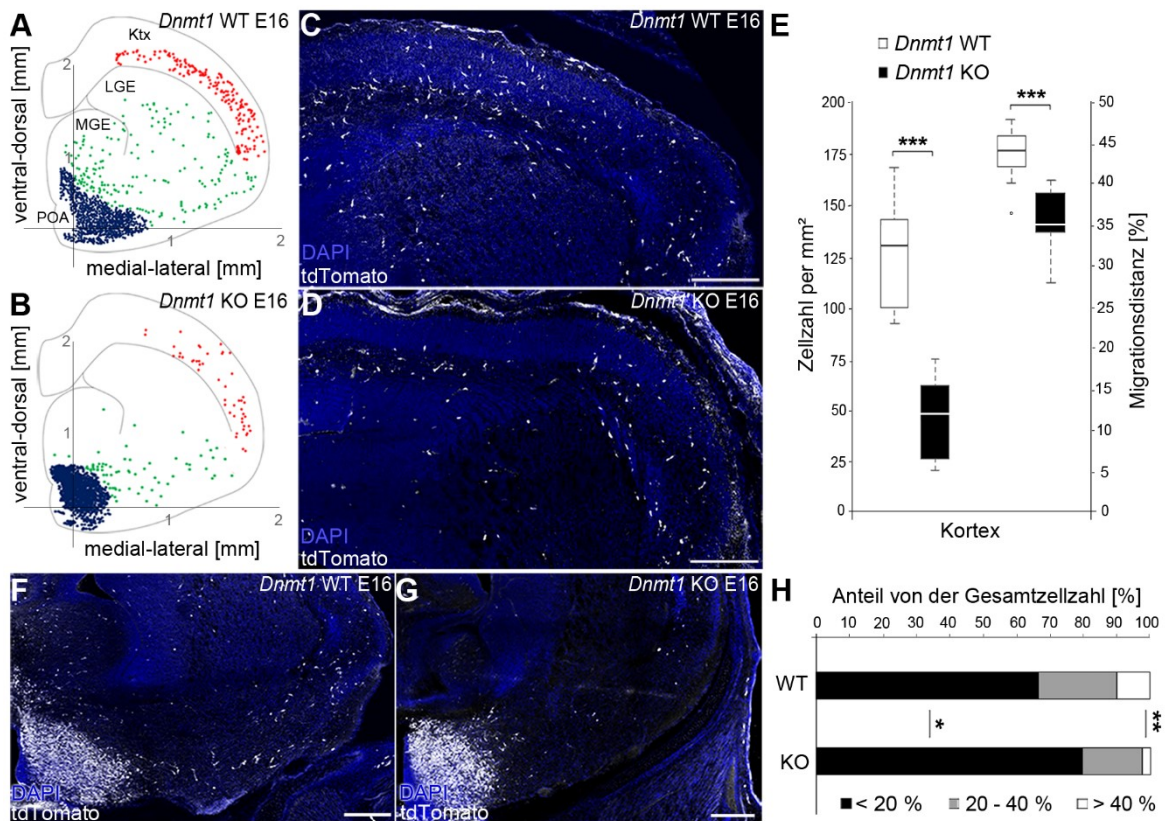
### **5.1. Die DNA-Methyltransferase 1 reguliert die Expression relevanter Gene in der Entwicklung von POA-abstammenden Interneuronen**

Das präoptische Areal (POA) ist eine der Ursprungsdomänen kortikaler Interneurone, welche zum Beispiel der *Hmx3*-exprimierenden Zellpopulation entstammen (Gelman et al., 2009; Gelman et al., 2011; Rubin und Kessar, 2013). Mit Hilfe Einzelzell-basierter Transkriptomanalysen konnten wir *Dnmt1* in postmitotischen POA-Zellen detektieren (Pensold et al., 2016). In Folge der konditionalen Deletion von *Dnmt1* in *Hmx3*-exprimierenden POA-Zellen konnte mittels umfassender phänotypischer Analysen eine signifikante Reduktion jener Zellen im adulten Kortex ausgemacht werden (Pensold et al., 2016). Diese war nicht auf eine Umverteilung in andere Areale zurückzuführen (Pensold et al., 2016). Vergleichende Transkriptomanalysen von embryonalen FACS-angereicherten Zellen aus *Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1* wildtypischen (*Dnmt1* Wildtyp; WT) und *Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1* loxP<sup>2</sup> (*Dnmt1* Knockout; KO) Gehirnen deuteten darauf hin, dass DNMT1 in die Regulation von Migration- und Zelltod-assoziierten Genen involviert sein könnte (Pensold et al., 2016). Ziel dieser Arbeit war es, anhand umfassender deskriptiver und funktionaler Studien eine mögliche Rolle von DNMT1 bei der Regulation der postmitotischen Entwicklung jener POA-abstammender Interneurone zu untersuchen.

#### **5.1.1. DNMT1 beeinflusst die tangentielle Migration POA-abstammender kortikaler Interneurone**

Zur Untersuchung der Fragestellung wurden phänotypische Analysen am Embryonaltag 16 (E16) durchgeführt und die Verteilung der zur *Hmx3*-Population gehörenden Zellen analysiert, welche das Reporterprotein tdTomato exprimierten (Abb. 7; (Gelman et al., 2009)).

Zu diesem Entwicklungszeitpunkt zeigte sich eine deutliche Expression von tdTomato in Zellen der Subventrikularzone des präoptischen Areals, sowie in zahlreichen migratorisch aktiven Zellen, von denen einige bereits den zerebralen Kortex erreicht hatten (Abb. 7A, C). Vergleichbar mit der Reduktion kortikaler Zellen in *Dnmt1*-defizienten Mäusen adulter Stadien, zeigte sich bereits an E16 in *Dnmt1* Knockout-Tieren eine signifikante Verringerung der im Kortex lokalisierten Zellen (Abb. 7B, D, E; (Pensold et al., 2016)).



Darüber hinaus wurde ersichtlich, dass an E16 wildtypische tdTomato-positive Zellen bereits signifikant weiter in den Kortex eingewandert waren als *Dnmt1*-defiziente Zellen (Abb. 7E).

Die Analyse der Zellverteilung im basalen Telenzephalon zeigte einen deutlich verringerten prozentualen Anteil an *Dnmt1*-defizienten Zellen, welche das POA verlassen hatten und tangential in Richtung Kortex wanderten (Abb. 7F-H). Im Vergleich zum Wildtyp ( $16,5 \% \pm 1,7$ ; n = 12 Hemisphären von 3 Embryonen)

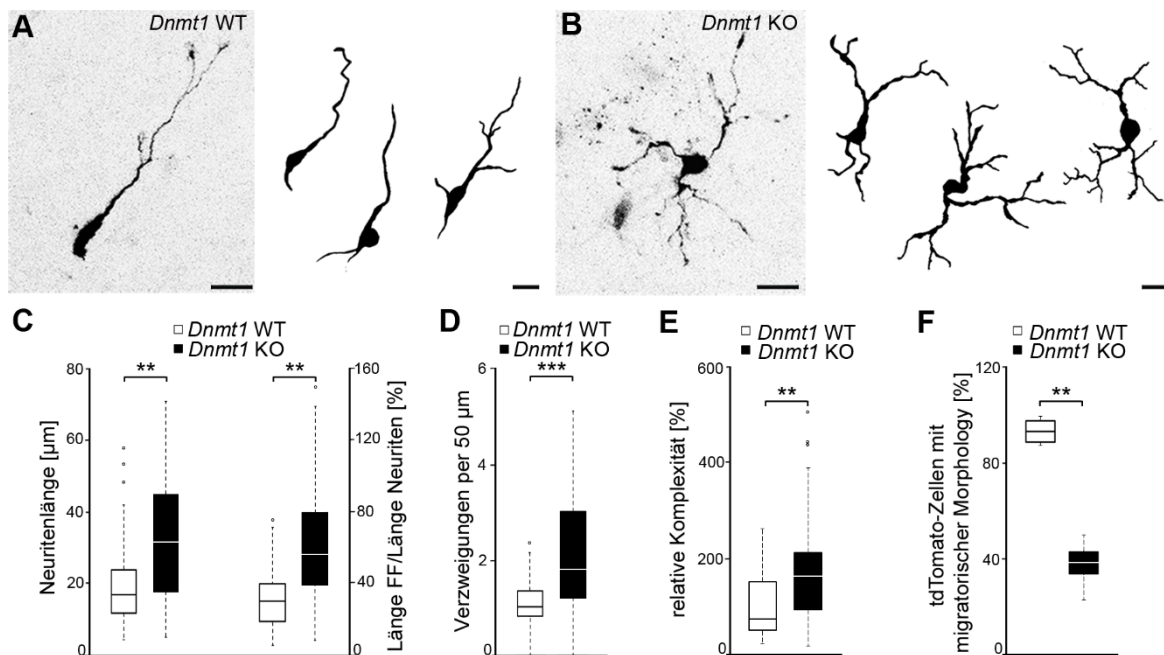
wurden nur  $8,9 \% \pm 0,9$  der *Dnmt1*-defizienten, tdTomato-positiven Zellen ( $n = 10$  Hemisphären von 3 Embryonen;  $**p < 0,01$ ; Studentscher t-Test) an E16 außerhalb des POA detektiert. Auch konnten für *Dnmt1*-defiziente Zellen im Vergleich zu wildtypischen Zellen signifikant geringer zurückgelegte Distanzen zwischen POA und Kortex detektiert werden (Abb. 7H).

Zusammengefasst deuten die verringerte Zellzahl migrierender *Dnmt1*-defizienter Zellen im Subpallium und Kortex, sowie die reduzierten Migrationsdistanzen auf eine Regulation der Wanderung jener POA-abstammenden postmitotischen Zellen durch DNMT1 hin. Dies wurde daher weiterführend untersucht.

### **5.1.2. DNMT1 reguliert die Morphologie und das Überleben migrierender POA-abstammender Interneurone**

Die Ausbildung einer bipolaren Morphologie mit einem verzweigten Führungsfortsatz und einem Folgeforsatz ist charakteristisch für migrierende Interneurone (Nadarajah und Parnavelas, 2002; Marin und Rubenstein, 2003). Zur detaillierteren Analyse der Migration wurden tdTomato-positive E16-Zellen im basalen Telenzephalon von wildtypischen und *Dnmt1* Knockout-Tieren hinsichtlich ihrer morphologischen Charakteristika untersucht (Abb. 8A, B).

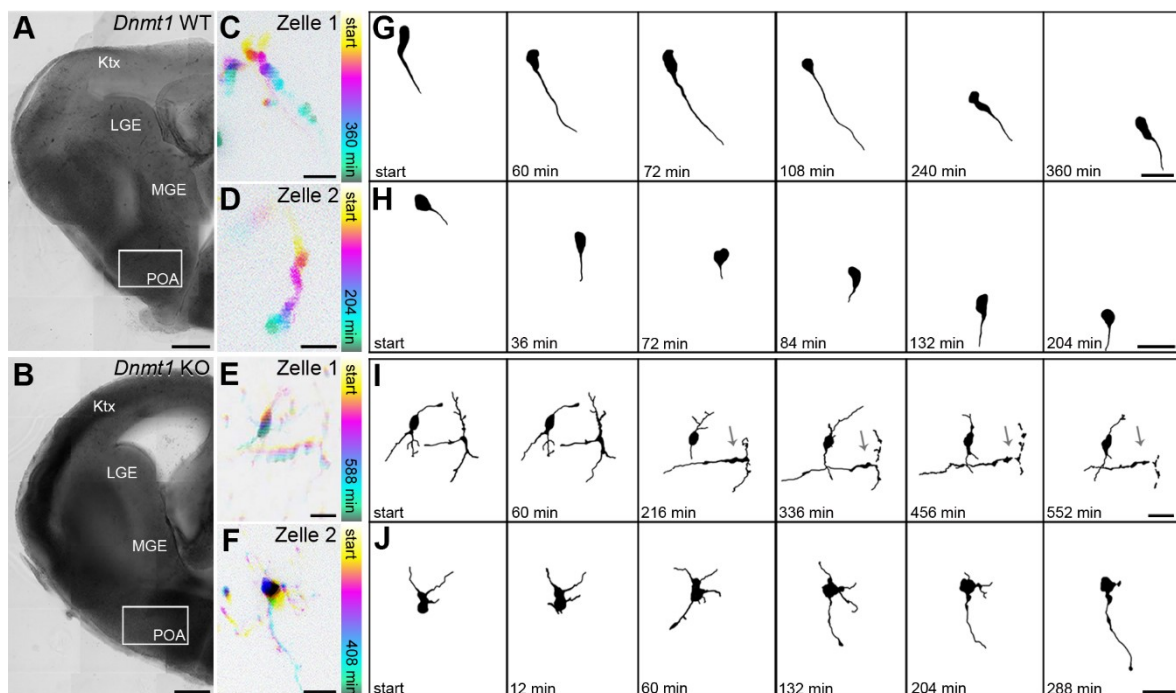
Obwohl sich die Länge des Führungsfortsatzes zwischen wildtypischen und *Dnmt1*-defizienten Zellen nicht signifikant unterschied (WT =  $64,5 \pm 5,8 \mu\text{m}$ ; KO =  $59,9 \pm 3,0 \mu\text{m}$ ;  $n = 22$  Zellen für WT;  $n = 36$  Zellen für KO; je 3 Gehirne;  $P = 0,554$ ; Studentscher t-Test), war die mittlere Länge aller weiteren von der Zelle ausgehenden Neuriten im *Dnmt1* Knockout deutlich erhöht (Abb. 8C). Dies spiegelte sich auch im prozentualen Verhältnis der mittleren Neuritenlänge zur Länge des Führungsfortsatzes wieder (Abb. 8C). Weiterhin wurde bei *Dnmt1*-defizienten Zellen eine erhöhte Ausbildung von Verzweigungspunkten des längsten Fortsatzes deutlich (Abb. 8D). Zusammen ergeben diese Parameter eine signifikant erhöhte Komplexität und sprechen damit für einen Verlust der typischen migratorischen Morphologie in Folge der *Dnmt1*-Deletion (Abb. 8E). Dies könnte die migratorische Aktivität negativ beeinflussen und somit eine Erklärung für die verringerte Fraktion von migratorisch aktiven Zellen liefern, welche im basalen Telenzephalon von *Dnmt1* Knockout-Embryonen ausgemacht wurde (Abb. 8F).



**Abbildung 8: *Dnmt1*-defiziente Zellen weisen eine untypische komplexe Morphologie auf.** (A, B) Invertierte mikroskopische Aufnahmen und illustrierte Darstellungen von repräsentativen tdTomato-positiven Zellen des basalen Telenzephalon aus 300 µm Vibratom-Schnitten von E16 *Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1* wildtypischen (A, *Dnmt1* WT) und *Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1 loxP2* Embryonen (B, *Dnmt1* KO). (C-F) Quantitative Analysen von Neuritenlänge und deren Relation zur durchschnittlichen Länge des Führungsfortsatzes (C), sowie der Anzahl an Verzweigungspunkten entlang des Führungsfortsatzes (D) verdeutlichen morphologische Unterschiede (n = 22 Zellen für *Dnmt1* WT, n = 36 für *Dnmt1* KO; je 3 Embryonen pro Genotyp). Der Führungsfortsatz ist definiert als der längste, vom Zellsoma abgehende Neurit. (E) Die relative Komplexität *Dnmt1*-defizienter Zellen entspricht dem Produkt aus der Anzahl an Neuriten vom Zellsoma, Verzweigungspunkten des Führungsfortsatzes und dem Verhältnis der Längen von Führungsfortsatz zu weiteren Neuriten, bezogen auf die durchschnittliche Komplexität wildtypischer Zellen. (F) Zellen mit typischer migratorischer Morphologie wurden anhand eines eindeutigen Führungs- und Folgefortsatz identifiziert (n = 97 Zellen für *Dnmt1* WT, n = 268 Zellen für *Dnmt1* KO; je 3 Embryonen pro Genotyp). \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; Studentischer t-Test. Maßstabsbalken: 10 µm in (A, B). FF; Führungsfortsatz

Die Annahme, dass der Verlust der typischen migratorischen Morphologie die Migration beeinträchtigt, konnte mithilfe von Zeitraffer-Aufnahmen über 15 h an E15 alten wildtypischen und *Dnmt1*-defizienten organotypischen Gehirnschnittkulturen bestätigt werden (Abb. 9). Hierfür wurden fluoreszente, tdTomato-positive Zellen aufgezeichnet, welche sich aus dem POA in das basale Telenzephalon bewegten (Abb. 9A-F). Wildtypische Zellen zeigten eine stereotype Fortbewegung mit der charakteristischen Ausbildung von Führungsfortsätzen und der darauffolgenden Translokation des Zellsomas in Migrationsrichtung (Abb. 9C, D, G, H; Film 1 & 2). Dagegen wiesen *Dnmt1*-defiziente Zellen eine insgesamt erhöhte Komplexität mit einer frühzeitigen Generierung von zahlreichen verzweigten Neuriten auf und waren vermindert migratorisch aktiv (Abb. 9E, F, I, J; Film 3 & 4).

Dies spiegelt sich auch in der Migrationsgeschwindigkeit wieder, welche auch alle nicht wandernden Neuriten-ausbildenden Zellen enthält. Diese war mit  $2,2 \pm 0,4 \mu\text{m/h}$  in wildtypischen Zellen signifikant höher als in *Dnmt1*-defizienten Zellen war mit  $0,9 \pm 0,2 \mu\text{m/h}$  ( $n = 75$  Zellen für WT von 3 Gehirnen,  $n = 130$  Zellen für KO von 5 Gehirnen;  $**p < 0,01$ ; Studentscher t-Test). Darüber hinaus zeigten *Dnmt1*-defiziente Zellen mit  $2,5 \pm 0,3$  Translokationen des Zellsomas in Migrationsrichtung pro Stunde eine signifikant verringerte Häufigkeit im Vergleich zu wildtypischen Zellen mit  $5,8 \pm 0,4$  Translokation pro Stunde ( $n = 75$  Zellen für WT von 3 Gehirnen,  $n = 130$  Zellen für KO von 5 Gehirnen;  $**p < 0,01$ ; Studentscher t-Test).



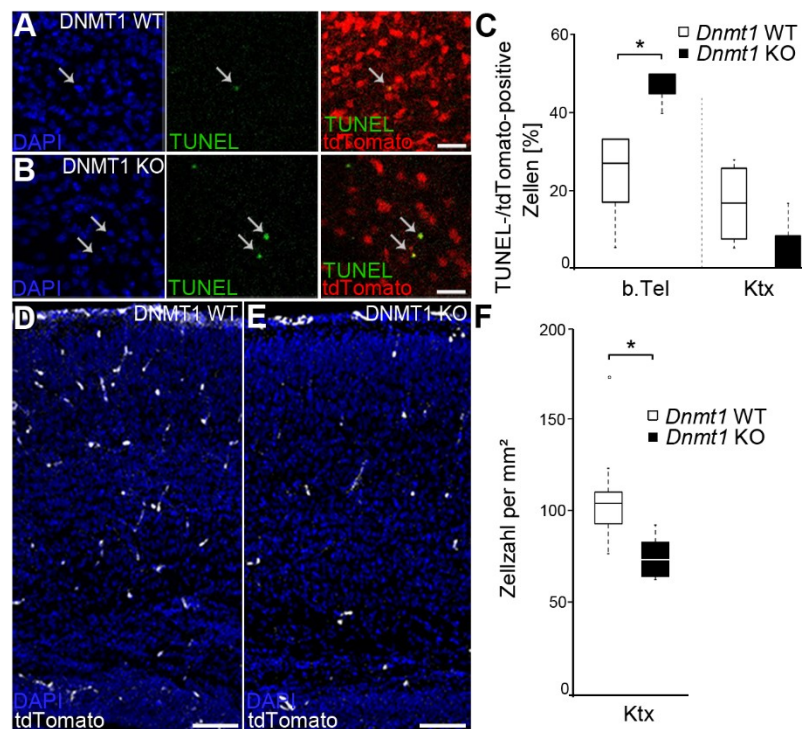
**Abbildung 9: Die Migrationskapazität von *Dnmt1*-defizienten Zellen ist verringert.** (A, B) Durchlichtaufnahmen repräsentativer organotypischer Hirnschnitte von E15 *Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1* wildtypischen (A, *Dnmt1* WT) und *Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1 loxP2* Embryonen (B, *Dnmt1* KO), die in Zeitrafferaufnahmen über 15 h mit 12 min Intervallen untersucht wurden. (C-F) Zeitlich farbkodierte Aufnahmen von *Dnmt1* WT (C, D) und *Dnmt1* KO (E, F) tdTomato-positiven Zellen aus dem basalen Telenzephalon außerhalb des POA, hervorgehoben durch den weißen Rahmen in (A) und (B). (G-J) Zur Verdeutlichung der Fortbewegung dargestellten Illustrationen der jeweiligen wildtypischen Zellen (G, H), sowie den *Dnmt1*-defizienten Zellen (I, J) an den entsprechenden Aufnahmezeitpunkten. Der Pfeil in (I) markiert eine *Dnmt1*-defiziente Zelle mit zunehmender Fragmentierung des Zellkörpers. Maßstabsbalken: 500  $\mu\text{m}$  in (A, B), 20  $\mu\text{m}$  in (C-J). Ktx, Kortex; LGE, laterale ganglionische Eminenz (GE), MGE, mediale GE; POA, präoptisches Areal.

Zusätzlich zu den morphologischen und migratorischen Auffälligkeiten, konnte bei *Dnmt1*-defizienten Zellen eine erhöhte Zellkörperfragmentierung detektiert werden (Abb. 9I Pfeile), welche zusammen mit den Ergebnissen der Transkriptomanalysen (Pensold et al., 2016) auf ein verstärktes Auftreten von Zellsterben im *Dnmt1* Knockout hinweist.



Dies konnte durch TUNEL-Färbungen bestätigt werden, die im basalen Telenzephalon am postnatalen Tag 0 (P0) eine erhöhte Anzahl TUNEL-positiver *Dnmt1*-defizienter Zellen ergab (Abb. 10A-C). Zellen, die den Kortex zu diesem Zeitpunkt erreicht hatten, zeigten dahingegen keine Unterschiede zum Wildtyp (Abb. 10C). Übereinstimmend mit dem früheren Entwicklungsstadium E16 wurde auch an P0 eine deutliche Reduktion in der Anzahl von in den Kortex migrierten tdTomato-positiven Zellen im konditionalen *Dnmt1* Knockout detektiert (Abb. 10D-F).

Zusammenfassend lässt sich somit annehmen, dass die Reduktion POA-abstammender kortikaler Zellen im *Dnmt1* Knockout auf einer gestörten Migration basiert und durch eine verfrühte Ausbildung einer multipolaren Morphologie, sowie einer erhöhten Sterberate bedingt wird. Diese Prozesse unterliegen einer komplexen transkriptionellen Regulation von assoziierten Genen, in die DNMT1 involviert sein könnte. Daher sollten weitere Untersuchungen aufzeigen, ob relevante Faktoren der direkten Regulation von DNMT1 unterliegen.



**Abbildung 10: Frühzeitig ausdifferenzierte Zellen des *Dnmt1* Knockouts zeigen erhöhte Sterberaten.** (A-C) Überlagerte mikroskopische Detailaufnahmen des basalen Telenzephalon mit TUNEL (grün), tdTomato (rot) und DAPI (blau) aus beispielhaften Hemisphären von P0 *Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1* wildtypischen (A) und *Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1 loxP2* Tieren (B). Quantifizierungen des Anteils sterbender TUNEL-positiver, tdTomato-positiver Zellen ist in (C) dargestellt (n = 5 Hemisphären von *Dnmt1* WT und KO von 4 Embryonen). (D-F) Ausschnitte von überlagerten mikroskopischen Aufnahmen des Kortex mit tdTomato (weiß) und DAPI (blau) von repräsentativen *Dnmt1* WT (D) und *Dnmt1* KO Gehirnschnitten (E) zur Analyse der durchschnittlichen Zelldichte (F; n = 5 Hemisphären von *Dnmt1* WT und KO aus 4 Embryonen). \*p < 0,05; Studentischer t-Test. Maßstabsbalken: 100 µm in (D, E); 30 µm in (A, B). b.Tel, basales Telenzephalon; Ktx, Kortex.

### 5.1.3. Die Expression von *Pak6* wird durch DNMT1 reguliert

Die proliferativen Zonen des basalen Telenzephalons generieren während der Gehirnentwicklung eine große Vielfalt an neuronalen und glialen Zellen, zusätzlich zu den verschiedenen Subtypen an ausmigrierenden Interneuronen, bestimmt für verschiedene zerebrale Regionen (Kriegstein und Alvarez-Buylla, 2009; Laclef und Metin, 2017). Neben ebenfalls entstehenden residualen Zellen, die an ihrem Bildungsort verbleiben und ausdifferenzieren, befinden sich in den jeweiligen Zonen darüber hinaus auch einwandernde Zellen aus anderen Bereichen des sich entwickelnden Gehirns (Laclef und Metin, 2017). Aufgrund dieser zellulären Heterogenität wurden zur Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen und unterschiedlicher Differenzierungsstadien RNA-Expressionsanalysen auf Einzelzellniveau mittels *Nanostring* Technik durchgeführt und detektierte Transkripte quantitativ und qualitativ untersucht (Pensold et al., 2016).

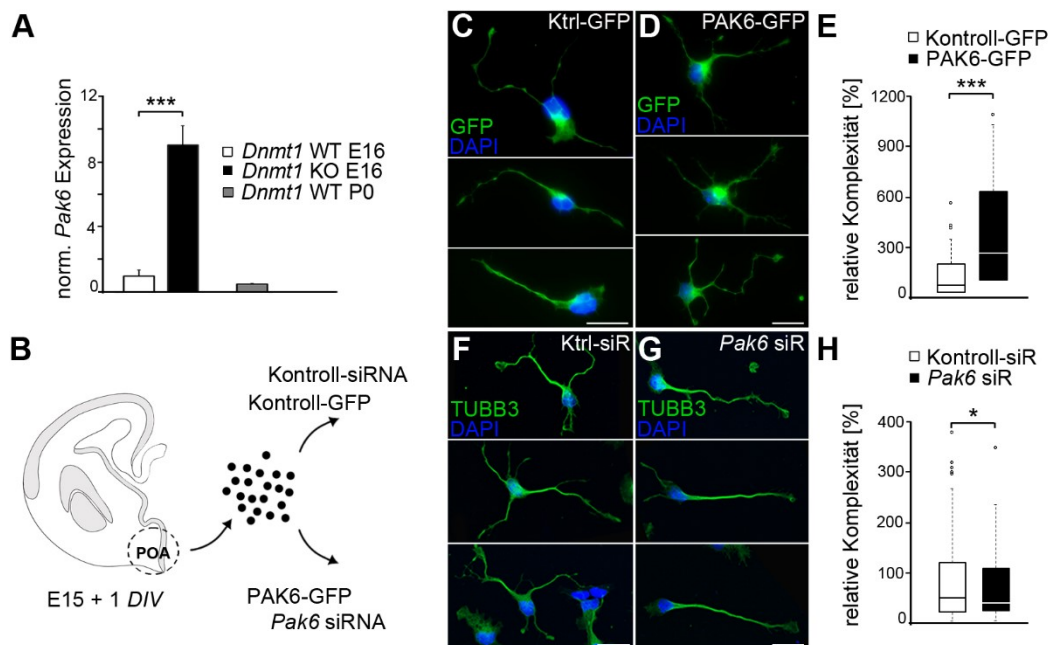
Auffällig war hierbei eine negative Korrelation der Expression von *Dnmt1* und *Pak6*, kodierend für ein Mitglied der Familie der Serin/Threonin-Proteinkinasen, welche an der Regulation des Zytoskeletts und Zelltods beteiligt sind (Pensold et al., 2016; Kumar et al., 2017). Dies verdeutlichte sich auch in der signifikant geringeren Expression von *Pak6* in *Dnmt1*-positiven Einzelzellen, welche als migrierende Population POA-abstammender Zellen identifiziert wurden (Pensold et al., 2016). Diese Daten weisen auf eine mögliche Repression der *Pak6* Expression durch DNMT1 in jenen Zellen hin. Damit einhergehend zeigte sich auch im Vergleich der Expressionsdaten von FACS-angereicherten Proben von *Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1* wildtypischen und *Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1 loxP<sup>2</sup>* Zellen ein starker Anstieg der *Pak6* Expression in Folge der Deletion von *Dnmt1* (Abb. 11A). Diese wurde für E16 freundlicherweise von Daniel Pensold bereitgestellt. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse auf eine DNMT1-abhängige Regulation der *Pak6* Expression in migrierenden POA-abstammenden Zellen der *Hmx3*-Population hin, was die Frage nach der Funktion von PAK6 in POA-abstammenden Zellen aufkommen lässt.

#### 5.1.4. Die Proteinkinase PAK6 besitzt sowohl Zellmorphologie- als auch Zelltod-regulierende Funktionen

Interessanterweise konnte für PAK6 bereits eine Beteiligung am Neuritenwachstum und der Ausbildung komplexer Zellstrukturen bei kortikalen exzitatorischen Neuronen herausgestellt werden (Zhao et al., 2011). Ist die erhöhte Expression von PAK6 in *Dnmt1* Knockout-Tieren somit möglicherweise an der gesteigerten Komplexität der embryonalen unreifen Interneurone aus dem POA beteiligt?

Zur Beantwortung dieser Frage wurde in wildtypischen E14 POA-Einzelzellkulturen eine Überexpression von PAK6 induziert (Abb. 11B-D). Tatsächlich wurde eine deutliche Erhöhung der Komplexität dieser Zellen beobachtet (Abb. 11E). Da ein Teil der Zellen endogen *Pak6* exprimiert (Pensold et al., 2016), konnten auch *Knockdown*-Experimente mit Hilfe von zielgerichteter siRNA an murinen POA-Einzelzellen durchgeführt werden. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Überexpression erzielte die spezifische Reduktion des *Pak6*-Expressionslevels den gegenteiligen Effekt, welcher sich in einer signifikant verringerten Komplexität der POA-Zellen darstellte (Abb. 11F-H). Dies deutet auf eine entscheidende Funktion des Proteins bei der Regulation der Ausdifferenzierung von POA-Zellen hin, welche in unreifen migrierenden Interneuronen aus diesem Areal mittels repressiver Expressionskontrolle von *Pak6* durch DNMT1 unterbunden wird.

Interessanterweise konnte am postnatalen Stadium P0 eine prominente *Pak6* Expression in wildtypischen POA-abstammende Zellen detektiert werden, welche im Kortex angelangt waren (Abb. 11A). PAK6 scheint somit auch in post-migratorischen Differenzierungsprozessen dieser POA-abstammenden Subpopulation involviert zu sein. Diese These wird durch Untersuchungen von Cobos und Kollegen (2007) unterstützt, welche das ebenfalls zur Familie der Serin/Threonin-Proteinkinasen gehörende und Neuritenwachstum-regulierende Protein PAK3 in MGE-abstammenden Interneuronen, insbesondere nach Erreichen des Kortex, verstärkt exprimiert vorfanden. Zusätzlich zu den morphologischen Auffälligkeiten zeigten Zellen von *Dnmt1* Knockout Tieren eine gesteigerte Mortalitätsrate, sowie eine signifikante Anreicherung von Zelltod-assoziierten Genen (**Fig 10**; (Pensold et al., 2016)). Studien an unterschiedlichen Zelllinien konnten verschiedenen Mitgliedern der PAK-Familie bereits Zelltod-regulierende Funktionen zusprechen (Deacon et al., 2003; Zhao et al., 2011; Stankiewicz und Linseman, 2014).

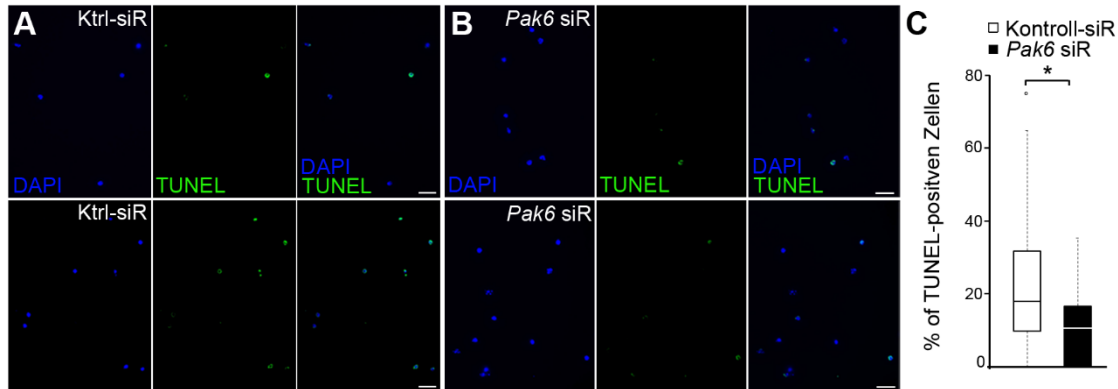


**Abbildung 11: PAK6 bewirkt morphologische Veränderungen in POA-Zellen.** (A) Quantitative Analyse der *Pak6* Expression mittels qPCR von FACS-angereicherten tdTomato-positiven Zellen des basalen Telenzephalons von E16 *Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1* wildtypischen und *Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1 loxP<sup>2</sup>* Tieren und tdTomato-positiven Zellen des P0 Kortex *Dnmt1* Wildtyp-Tiere (normalisiert gegen *ActB* und *Rps29*). (B) Schematische Abbildung eines koronalen, murinen Hirnschnittes veranschaulicht die an E14 für die Kultivierung von dissoziierten POA-Einzelzellen und Transfektion präparierte Region im basalen Telenzephalon (gestrichelte Linie). (C-H) Überlagerte, mikroskopische Aufnahmen zeigen exemplarisch kultivierte E14 (+1 DIV) Einzelzellen des POA von C57BL/6 Mäusen nach Kontroll- (C) und *Pak6*-GFP-Plasmid Transfektion (D), sowie Kontroll- (F) und *Pak6* siRNA (G) -Transfektion mit GFP (C, D; grün), TUBB3 (F,G; grün) und DAPI (blau), entsprechend quantifiziert als relative Komplexität (E, H). Diese entspricht dem Produkt aus Neuritenanzahl, Anzahl an Verzweigungspunkten des Führungsfortsatzes und dem Verhältnis der Längen von Führungsfortsatz und weiterer Neuriten, jeweils in Bezug zur Kontrolltransfektion (n = 22 Zellen für Kontroll-Plasmid; n = 22 Zellen für *Pak6*-Plasmid; n = 36 Zellen für Kontroll-siRNA; n = 55 Zellen für *Pak6* siRNA; je 3 verschiedenen Experimente). \*p < 0,05; \*\*\*p < 0,001; Studentischer t-Test. Maßstabsbalken: 10 µm in (C, D, F, G). DIV, „days in vitro“; POA, präoptisches Areal.

Inwieweit PAK6 neben der Morphologie auch Einfluss auf das Überleben POA-abstammender Zellen hat, wurde mit Hilfe des TUNEL-Assays an embryonalen Einzelzellen (E14) des POA untersucht. Nach siRNA-vermittelter Reduktion von *Pak6 in vitro* konnte in der Tat eine deutlich geringere Rate an TUNEL-positiven und somit sterbenden Zellen in wildtypischen POA-Einzelzellen detektiert werden (Abb. 12). Daraus ergibt sich die Annahme, dass PAK6 durchaus eine Rolle bei der Regulation des Überlebens POA-abstammender Zellen zu spielen scheint.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Modulation der *Pak6* Expression in embryonalen POA-abstammenden Zellen *in vitro* einen Einfluss auf deren Morphologie und Überleben hat, wobei ein gesteigertes PAK6 Level mit einer Zunahme der Komplexität und einer erhöhten Zelltodrate korreliert.

Somit könnte die erhöhte *Pak6* Expression in *Dnmt1*-defizienten Zellen durchaus zum Verlust ihrer migratorischen Morphologie und Kapazität beitragen, sowie eine erhöhte Mortalität nach sich ziehen.



**Abbildung 12: Die Reduktion der *Pak6* Expression in POA-Zellen erhöht ihr Überleben.** (A, B) Exemplarische Aufnahmen von Kontroll-siRNA (A) und *Pak6* siRNA (B) -behandelten, kultivierten E14 (+1 DIV) Einzelzellen des POA mit TUNEL (grün) und DAPI (blau) zur Darstellung des Anteils sterbender Zellen. (C) Quantifizierung des Anteils TUNEL-positiver Zellen (n = 316 Zellen für Kontroll-siRNA; n = 286 Zellen für *Pak6* siRNA aus 3 verschiedenen Experimenten). \*p < 0,05; Studentischer t-Test. Maßstabsbalken: 20 µm in (A, B).

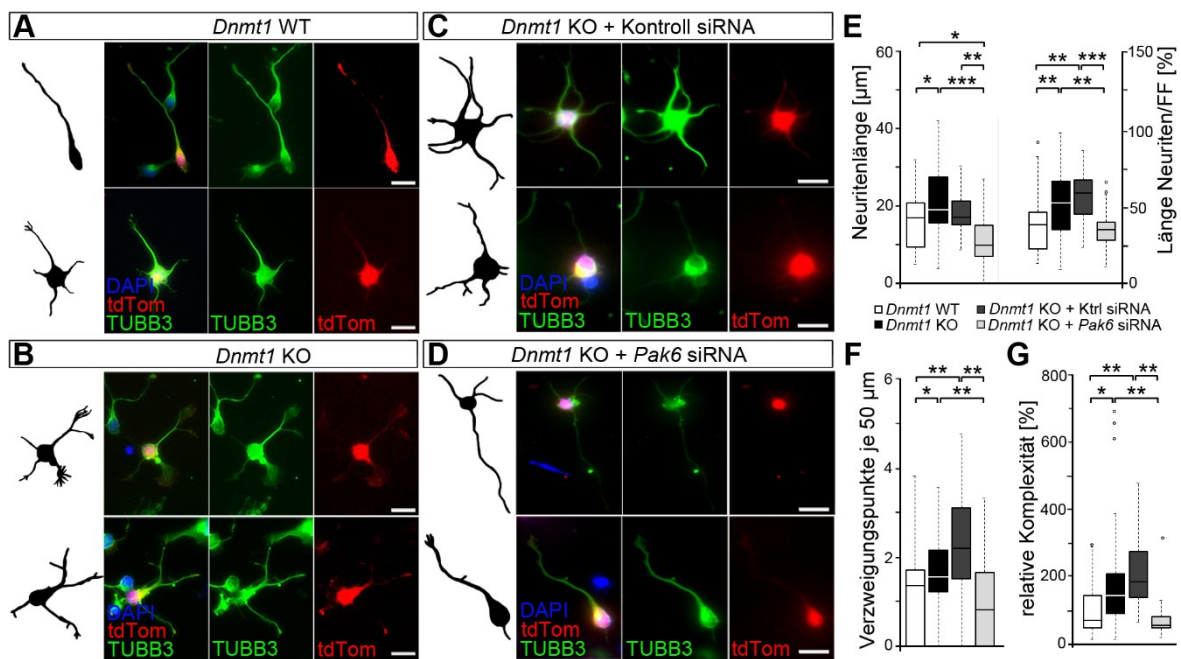
#### 5.1.5. Die erhöhte Komplexität *Dnmt1*-defizienter POA-Zellen kann durch induzierte *Pak6* Reduktion deutlich vermindert werden

Inwiefern der Anstieg der *Pak6* Expression für die, im Gegensatz zu wildtypischen Zellen, erhöhte morphologische Komplexität *Dnmt1*-defizienter POA-Zellen ursächlich ist, sollten weitere Untersuchungen herausstellen. Hierfür wurde in kultivierten E14 Zellen des *Dnmt1* Knockouts das *Pak6*-Expressionslevel durch Transfektion mit zielgerichteter siRNA reduziert (Abb. 13). Ist es möglich die charakteristische Morphologie wildtypischer Zellen wiederherzustellen?

Zu Vergleichszwecken wurden sowohl wildtypische als auch *Dnmt1*-defiziente Zellen kultiviert. Zellen des Knockouts wiesen ähnlich wie in analysierten Gewebeschnitten (siehe Abb. 8) eine signifikant erhöhte durchschnittliche Neuritenlänge mit weniger prominentem Führungsfortsatz, sowie eine erhöhte Verzweigungsrate und eine damit insgesamt erhöhte Komplexität auf (Abb. 13A, B, E-G). Diese Veränderungen der morphologischen Merkmale *Dnmt1*-defizienter Zellen konnten durch *Pak6* siRNA-Behandlung signifikant verringert werden (Abb. 13C). In allen ausgewerteten Parametern zeigten sich nach Reduktion des *Pak6*-Levels keine

signifikanten Unterschiede zu wildtypischen Zellen (Abb. 13E-G), wohingegen Kontroll-siRNA-behandelte *Dnmt1*-defiziente Zellen weiterhin eine deutlich komplexere Zellmorphologie aufwiesen (Abb. 13 D-G). Aufgrund der kurzen Kultivierungsdauer der Einzelzellen von 24 h nach siRNA-Behandlung bis zur Fixierung entspricht die schnelle Anpassung der Zellmorphologie vermutlich den in der Literatur bekannten Funktionen von p21-aktivierten Kinasen (PAK) in der Reorganisation von zytoskelettalen Zellbestandteilen (Kumar et al., 2017).

Die dargestellten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass DNMT1 die Expression von *Pak6* in postmitotischen Zellen aus dem präoptischen Areal reprimiert, somit ein frühzeitiges Ausbilden einer komplexen Zellmorphologie verhindert und die migratorische Aktivität der unreifen Interneurone erhält. Inwieweit die Genexpression von *Pak6* direkt durch DNMT1-vermittelte DNA-Methylierung reguliert wird, sollte im Folgenden untersucht werden.



**Abbildung 13: Die Reduktion des *Pak6*-Expressionslevels in *Dnmt1*-defizienten Zellen führt zu Wiederherstellung typischer morphologischer Charakteristika migrierender Interneurone.** (A-D) Graphische Illustrationen und mikroskopische überlagerte Aufnahmen repräsentativer E16 (+1 DIV) *Hmx3-Cre/TdTomato/Dnmt1* wildtypischer (A, *Dnmt1* WT) und *Hmx3-Cre/TdTomato/Dnmt1 loxP2* Einzelzellen (B, *Dnmt1* KO) aus dem POA, sowie letztere nach Kontroll-siRNA (C) und *Pak6* siRNA-Behandlung (D) mit TUBB3 (grün), tdTomato (rot) und DAPI (blau). Quantifiziert wurden die durchschnittliche Neuritenlänge, deren Verhältnis zur Länge des Führungsfortsatzes (E) und dessen Verzweigungen (F). Zusammengefasst ergibt das Produkt dieser Parameter in Bezug zu wildtypischen Kontrollzellen die relative Komplexität (G; n = 29 für *Dnmt1* WT Zellen; n = 38 für *Dnmt1* KO-Zellen; n = 17 für Kontroll-siRNA-transfizierte *Dnmt1* KO-Zellen; n = 18 für *Pak6* siRNA-transfizierte *Dnmt1* KO-Zellen). Der Führungsfortsatz ist definiert als der längste Neurit einer Zelle. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 Studentischer t-Test. Maßstabsbalken: 10 µm in (A-D).

#### 5.1.6. Die *Pak6* Expression scheint nicht durch direkte DNA-Methylierung des *Pak6* Genlocus reguliert zu werden

Stark methylierte DNA-Bereiche korrelieren in vielen Fällen mit einer verminderten Expression von Genen (Fagiolini et al., 2009; Jin et al., 2011; Akbarian et al., 2013). Zur Untersuchung methylierungsabhängiger Veränderungen in der Genexpression zwischen wildtypischen und *Dnmt1* Knockout-Tieren, wurden in Kooperation mit dem *Transcriptome and Genome Analysis Laboratory* (TAL) in Göttingen methylierte DNA-Abschnitte von FACS-isolierten Zellen (E16) mittels Immunopräzipitation (*Methylated DNA immunoprecipitation*, MeDIP) angereichert und analysiert (Pensold et al., 2016). Die erhaltenen Daten zeigten keine signifikanten Veränderungen des Methylierungsmuster im Genlocus von *Pak6* sowie potentieller Regulatoren (Pensold et al., 2016). Dies lässt vermuten, dass die Regulation der *Pak6* Expression wahrscheinlich nicht über eine DNMT1-vermittelte DNA-Methylierung realisiert wird.

Diese These wurde durch das Ausbleiben eines Anstieges der *Pak6* Expression in N2a-Zellen bekräftigt, welche mit dem DNMT-spezifischen Inhibitor RG108 behandelt wurden (Abb. 14A). RG108 blockiert die DNA-Bindungsdomäne von DNMT's, woraufhin die Methylierung der DNA verhindert wird (Brueckner et al., 2005). Dabei bleiben jedoch andere Domänen zur Bindung von interagierenden Proteinen sowie die katalytische Domäne zur Übertragung von Methylgruppen hinsichtlich ihre Funktion unbeeinträchtigt (Yoo et al., 2013; Asgatay et al., 2014). Eine signifikante Steigerung des *Pak6*-Expressionsniveau in N2a-Zellen zeigte sich nur nach siRNA-vermittelter Reduktion des *Dnmt1*-Expressionslevels (Abb. 14A).

Da die Expression von *Pak6* somit sehr wahrscheinlich nicht direkt durch DNA-Methylierung reguliert zu werden scheint, sollten weitere Untersuchungen aufklären, inwieweit DNMT1-vermittelte, jedoch DNA-Methylierungs-unabhängige Mechanismen die *Pak6* Expression lenken.



### 5.1.7. DNMT1-abhängige Veränderungen spezifischer Histonmodifikationen scheinen die Genexpression von *Pak6* zu steuern

Neben der Übertragung von Methylgruppen auf spezifische Cytosine konnten verschiedene Studien zeigen, dass DNMT1 mit Histon-modifizierenden Proteinkomplexen, wie dem Polycomprepressor-Komplex 2 (PCR2) interagiert (Liu et al., 2015; Ning et al., 2015; Peng et al., 2015). PCR2 und sein Kernenzym EZH2 sind im Hinblick auf ihre Funktion bei der Repression der Genexpression vor allem mit der Ausbildung der Histonmarkierung H3K27me3 assoziiert (Margueron und Reinberg, 2011).

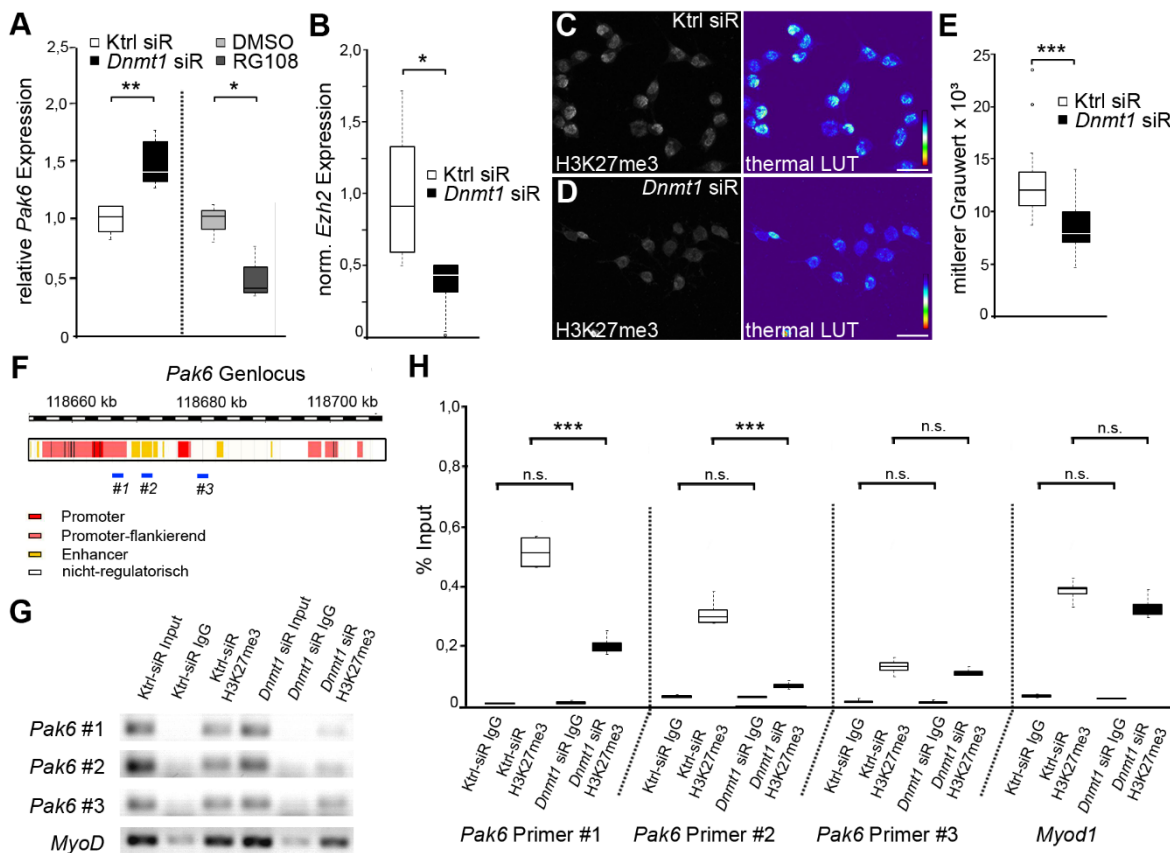
Um eine potentielle Regulation von *Pak6* über Veränderungen in der PCR2-vermittelten Histonmodifikation zu untersuchen, wurde zunächst das RNA-Expressionslevel von *Ezh2* in *Dnmt1* siRNA und Kontroll-siRNA-behandelten, murinen N2a-Zellen mittels qPCR verglichen (Abb. 14B). Die siRNA-vermittelte Reduktion von *Dnmt1* führte hierbei zu einer signifikanten Verringerung des Expressionslevels von *Ezh2*. Inwieweit diese mögliche Reduktion des *Ezh2*-Niveaus Veränderungen von Histonmodifikationen zur Folge hat und somit einen Mechanismus für die Methylierungs-unabhängige Regulation der *Pak6* Expression bieten könnte, sollte im Rahmen weiterer Untersuchungen näher betrachtet werden.

Zur Detektion von Veränderungen in der H3K27-Trimethylierung wurden immunohistochemische Färbungen von H3K27me3 an *Dnmt1* und Kontroll-siRNA-behandelten N2a-Zellen durchgeführt und hinsichtlich ihres Fluoreszenzintensitätsniveaus verglichen (Abb. 14C, D). Hierbei zeigten sich nach selektiver Reduktion des *Dnmt1*-Expressionslevels signifikant geringere Fluoreszenzintensitäten, welche auf eine reduzierte Ausbildung von Trimethylierungen an H3K27 hinweisen (Abb. 14E). Die Daten wurden freundlicherweise von Christiane Schmidt zur Verfügung gestellt.

Eine verringerte Trimethylierung von H3K27 ist oft mit einer erhöhten Genexpression verbunden (Young et al., 2011; Reddington et al., 2013; Liu et al., 2016). Um zu untersuchen, ob es zu Veränderungen des H3K27me3-Levels an *Pak6*-assoziierten Genloci kommt, wurden anschließend Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIP), gefolgt von quantitativer, *real-time* PCR (qPCR) an N2a-Zellen durchgeführt (Abb. 14F-H).



Das quantitativ bestimmte Level der an H3K27me3-Antikörper gebundenen DNA-Fragment/Histon-Komplexe gibt durch Detektion mit spezifischen DNA-Primern, normalisiert auf das eingesetzte DNA-Material (Input), Auskunft über die Häufigkeit dieser repressiven Histonmarkierung an bestimmten DNA-Positionen. Der unspezifisch durch den Antikörper gebundene DNA-Gehalt wurde mittels IgG-Kontrolle bestimmt. Die Experimente wurden größtenteils von Christiane Schmidt durchgeführt.



**Abbildung 14: Die *Pak6* Expression ist durch DNMT1-bedingte Veränderung der H3K27-Trimethylierung, unabhängig von direkter Genmethylierung, reguliert.** (A, B) Quantitative Messung der *Pak6* (A) und *Ezh2* Expression (B) mittels qPCR in N2a-Zellen nach Kontroll- und *Dnm1* siRNA-Transfektion. Die Bestimmung der *Pak6* Expression erfolgte ebenso nach Applikation von RG108 verglichen zur DMSO-Kontrolle. (C-E) Mikroskopische Aufnahmen von Kontroll-siRNA (C) und *Dnm1* siRNA (D)-transfizierten N2a-Zellen nach H3K27me3 immunhistochemischer Fluoreszenzmarkierung. Die Intensität ist dargestellt im schwarz-weiß Kontrast und nach thermaler Farbkodierung (thermal LUT), sowie quantifiziert als mittlerer Grauwert (E; n = 24 Zellen für Kontroll-siRNA; n = 21 Zellen für *Dnm1* siRNA). (F) Potentielle Promotor (rot)-, Promotor-flankierende (rosa) und Enhancer (gelb)-Bereiche entlang des *Pak6*-Genkörpers, sowie Lokalisationen von *Pak6*-Primerbindungsstellen in Promotor-assoziierten (#1), Enhancer-assoziierten (#2) und außerhalb des Promotors befindlichen (#3) Bereiche. (G) Geldokumentation der quantitativen Bestimmung des über ChIP mittels H3K27me3-spezifischen Antikörper isolierten DNA-Gehalts der in (F) dargestellten Primerpositionen im Vergleich zwischen Kontroll- und *Dnm1* siRNA-transfizierten N2a-Zellen. Der Gehalt unspezifisch gebundener DNA ist durch IgG angezeigt. (H) Quantitative PCR nach ChIP mit H3K27me3-spezifischen Antikörper und IgG als Hintergrundkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse für die in (F) angezeigten Primerpositionen im *Pak6* Genlocus und für eine Position im *Myod1* Genpromotor. Normalisiert wurde auf das eingesetzte DNA-Material jeder Probe (Input; 3 individuelle ChIP-Experimente mit je 4 technischen Replikaten). \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 Studentischer t-Test. Maßstabsbalken: 20 µm in (C, D thermal LUT).

Für Kontroll-siRNA-behandelten N2a-Zellen konnte an allen Primerpositionen im *Pak6* Genlocus eine Assoziation mit H3K27me3 detektiert werden (Abb. 14 F-H, #1-3). Dabei waren stärkere Assoziationen in regulatorischen Regionen detektierbar (Abb. 14 F-H, #1, #2) und weniger intensive in der nicht-regulatorischen Region (Abb. 14 F-H, #3). Die Daten entsprechen so einem bekannten Muster dieser Histonmodifikation, welches zur entsprechenden Genrepression führen kann (Young et al., 2011; Reddington et al., 2013; Liu et al., 2016).

In *Dnmt1* siRNA-behandelten N2a-Zellen mit erhöhtem *Pak6*-Expressionsniveau zeigte sich im Vergleich zu Kontroll-siRNA-kultivierten Zellen eine hochsignifikante Reduktion des mittels H3K27me3 gebundenen und isolierten DNA Gehalts in der Promotor-assoziierten und der Enhancer-Region von *Pak6* (Abb. 14H, #1, #2). Der Bereich außerhalb regulatorischer Regionen zeigte keine Veränderungen und diente zusätzlich als interne Kontrolle der Spezifität (Abb. 14H, #3), der in anderen Regionen ermittelten Veränderungen.

Als Positiv-Kontrolle wurde eine Promotorregion des *Myod1* Genlocus untersucht (Abb. 14G, H). *Myod1* kodiert für einen bHLH-Transkriptionsfaktor, welcher die Differenzierung zu skelettalen Muskelzellen initiiert und steuert (Kablar, 2002). Daher unterliegt seine Expression während der Neurogenese üblicherweise der Repression, zum Beispiel durch intensive H3K27-Trimethylierung (Wang et al., 2013). Sowohl in Kontroll- als auch in *Dnmt1* siRNA-behandelten N2a-Zellen war der Genpromotor von *Myod1* stark mit H3K27me3 assoziiert (Abb. 14G, H).

Insgesamt deuten die reduzierte Expression von *Ezh2* und die geringere Assoziation der repressiven Histonmarkierung H3K27me3 mit regulatorischen *Pak6*-Genregionen nach Reduktion des *Dnmt1*-Levels auf eine methylierungs-unabhängige Regulation der *Pak6* Expression hin. Dies könnte eine erhöhte Expression von *Pak6* ermöglichen. Demzufolge scheint die Regulation des Histon-modifizierenden Enzyms EZH2 durch DNMT1 für die Ausbildung von trimethylierten H3K27 entscheidend zu sein.

Summa Summarum spielt die spezifische Kontrolle der Genexpression für die Entwicklung kortikaler Interneurone mit Ursprung im präoptischen Areal eine ausgesprochen essentielle Rolle. Üblicherweise zeigen migrierende Interneurone eine typische und wenig komplexe Morphologie mit einem prominenten Führungsfortsatz in Migrationsrichtung (Nadarajah und Parnavelas, 2002; Marin und Rubenstein, 2003). Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse verdeutlichen, dass die DNA-Methyltransferase die Expression von *Pak6* in unreifen POA-abstammenden Interneuronen reprimiert und somit die Migration in den Kortex und das Überleben jener Zellen sichert. Eine durch die p21-aktivierte Proteinkinase initiierte Ausbildung einer komplexeren Zellmorphologie in migrierenden Zellen, sowie der Zelltod von falsch lokalisierten und frühzeitig ausdifferenzierten Zellen wird durch DNMT1-vermittelte Genrepression von *Pak6* verhindert. Dabei zeigte sich, nicht wie zuerst angenommen, eine durch den kanonischen Wirkmechanismus von DNMT1 regulierte Expressionskontrolle durch DNA-Methylierung (Pensold et al., 2016). Vielmehr unterstützen die Untersuchungen die Wichtigkeit der vielseitigen Interaktionen und dem Zusammenspiel von DNMT1 mit Histon-modifizierenden Enzymen in Hinblick auf die Regulation der *Pak6* Genexpression über Veränderungen der H3K27-Trimethylierung.

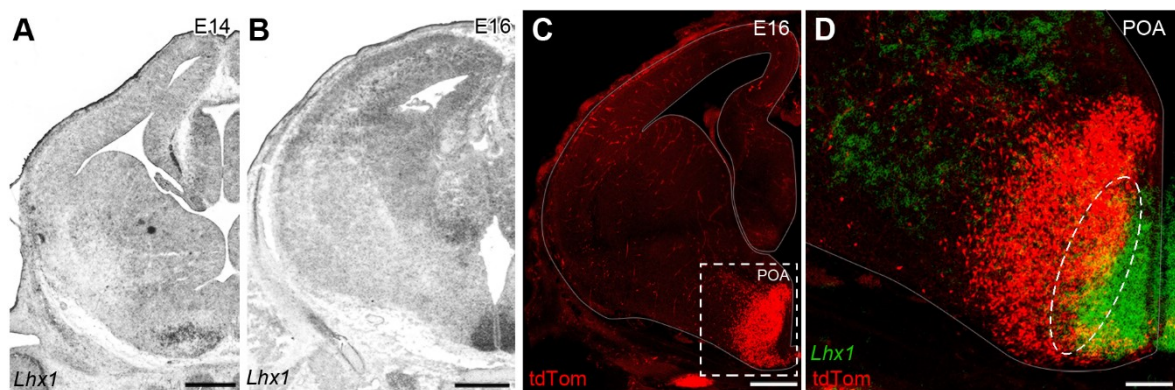
## **5.2. Der durch DNMT1-regulierte Transkriptionsfaktor LHX1 ist an der Entwicklung kortikaler Interneurone beteiligt**

Die Entwicklung kortikaler Interneurone aus mitotischen Vorläufern bis hin zu ausdifferenzierten und funktionell integrierten, inhibitorischen Neuronen ist wie bereits erwähnt durch eine differentielle Expression bestimmter Gene und deren Genprodukte fein reguliert. Hierbei konnte im vorangegangenen Kapitel die DNA-Methyltransferase DNMT1 erstmals als ein wichtiger Regulator der Genexpression in einer Gruppe POA-abstammender Interneurone dargestellt werden. Es ist anzunehmen, dass neben dem für die Serin/Threonin-Proteinkinase PAK6 kodierenden Gens auch weitere wichtige Faktoren der Expressionkontrolle von DNMT1 unterliegen. Besonders in den Vordergrund rücken hierbei Transkriptionsfaktoren, welche differenziell die Expression einer ganzen Reihe von untergeordneten Zielgenen steuern können und somit eine höchst wichtige Rolle bei der Entwicklung spezifischer Interneuron-Eigenschaften einnehmen (Marin und Rubenstein, 2001; Puelles und Rubenstein, 2003; Flames und Hobert, 2009). Ausgangspunkt weiterer Untersuchungen war somit die Frage, inwieweit für die Entwicklung von POA-abstammenden Neuronen wichtige Transkriptionsfaktoren ebenfalls zu den Zielgenen von DNMT1 gehören.

### **5.2.1. Die Expression von *Lhx1* überlappt in Regionen des POA mit dem postmitotisch exprimierten Transkriptionsfaktor HMX3**

Ähnlich wie PAK6 zeigt auch der Transkriptionsfaktor LHX1 Zelltod-regulierende Funktionen in verschiedenen Zelltypen (Dormoy et al., 2011; Bedont et al., 2014; Huang et al., 2014). LHX1 gehört zu der Familie der LIM-HD-Transkriptionsfaktoren (Hobert und Westphal, 2000), aus welcher für einige Mitglieder bereits eine essentielle Beteiligung in der Differenzierung von Interneuronen und auch an der Regulation der Zellmigration gezeigt wurde (Hukriede et al., 2003; Liodis et al., 2007; Pillai et al., 2007; Saha et al., 2007; Avraham et al., 2009; Palmesino et al., 2010). Während der Hauptphase der Interneuron-Generierung zwischen E14 und E16 ist *Lhx1* vor allem in der Subventrikular- (SVZ) und Ventrikularzone (VZ) der POA exprimiert, wie *in situ* Hybridisierungen mit spezifischen RNA-Sonden zeigten (Abb. 15A-C).

Diese bestätigen Vorarbeiten, in denen *Lhx1* mittels *Next Generation Sequencing* und quantitativer RT-PCR, verglichen zur MGE signifikant erhöht im präoptischen Areal ermitteln konnten ((Pensold et al., 2016); unveröffentlichte Daten). Wie zuvor erwähnt, markiert der Transkriptionsfaktor HMX3 eine Gruppe postmitotischer POA-Zellen (Gelman et al., 2009; Pensold et al., 2016). Auf eine Expression von *Lhx1* in jenen *Hmx3*-exprimierenden Zellen deuten Überlagerungen von *Lhx1* *in situ* Hybridisierungen und dem fluoreszenten Signal von tdTomato an alternierenden Gehirnschnitten von *Hmx3-Cre/tdTomato loxP<sup>2</sup>* wildtypischen Reportermausen hin (Abb. 15D, E). Hierbei zeigte sich eine partielle Überlagerung von postmitotischen Zellen der *Hmx3*-Population und *Lhx1* im subventrikulären Bereich des POA. Aufgrund der bereits bekannten Funktionen vieler LIM-HD Familienmitglieder könnte LHX1 somit durchaus relevant für die Entwicklung jener POA-abstammenden Zellen sein und rückte somit in den Mittelpunkt weiterer Studien.



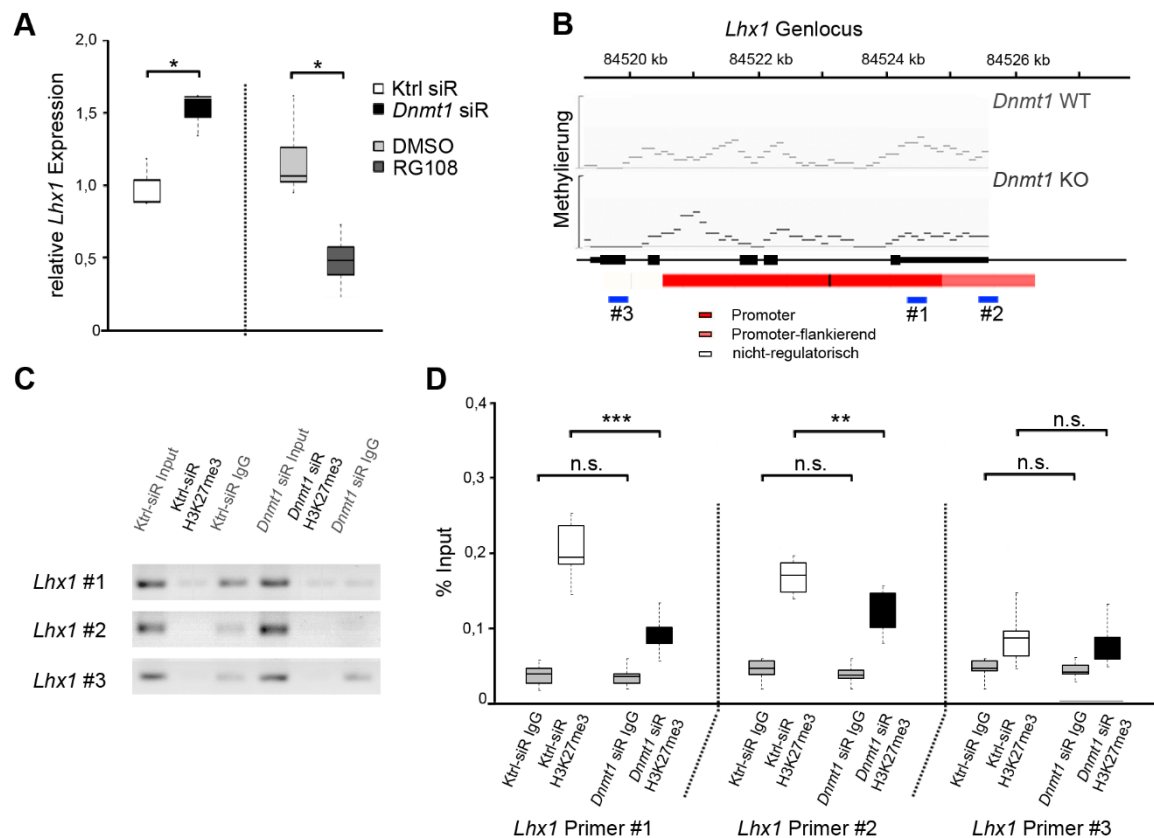
**Abbildung 15: Die Expression von *Lhx1* überlappt im subventrikulären Bereich des POA mit HMX3.** (A, B) *In-situ* Hybridisierungen mit *Lhx1*-spezifischer RNA-Sonde an E14 (A) und E16 (B) in koronalen Hirnschnitten. (C) Exemplarische, mikroskopische Aufnahme der tdTomato-Reporterproteinexpression (rot) im koronalen Hirnschnitt von E16 *Hmx3/tdTomato* wildtypischen Embryonen. (D) Überlagerung mikroskopischer Detailaufnahmen des POA (vergrößerter Bereich aus C, weißer Rahmen) mit farbkodierter *Lhx1* mRNA (grün) und *Hmx3*-abhängiger tdTomato-Expression (rot) von anatomisch aufeinanderfolgenden E16 Gehirnschnitten. Der weiß umrandete Bereich deutet auf die relevante Zone der überlappenden Expression hin. Maßstabsbalken: 500 µm in (A-C). 100 µm in (D).

### 5.2.2. DNMT1 reguliert die Expression von *Lhx1* scheinbar unabhängig von direkter DNA-Methylierung seines Genlocus

Wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt, reguliert DNMT1 wichtige Gene bei der Entwicklung von Interneuronen. Erste Hinweise, inwieweit die Expression von *Lhx1* durch DNMT1 reguliert werden könnte, lieferten quantitative Messungen der *Lhx1*

Expressionslevel in *Dnmt1* und Kontroll-siRNA-behandelten murinen N2a-Zellen (Abb. 16A). Auch hier wurde - ähnlich wie für *Pak6* - ein signifikanter Anstieg der Genexpression nach Reduktion des *Dnmt1* Expressionsniveaus detektiert.

Interessanterweise zeigte sich auch keine erhöhte *Lhx1*-Expression nach alleiniger Blockierung der DNA-Methylierungsfunktion durch RG108 Applikation in N2a-Zellen (Abb. 16A). Übereinstimmend damit konnten in Kooperation mit dem *TAL Göttingen* durchgeführte MeDIP-Analysen von *Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1* wildtypischen und *Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1 loxP<sup>2</sup>* Zellen (E16) keine quantitativen Unterschiede im Methylierungslevel im *Lhx1* Genlocus aufzeigen (Abb. 16B).



**Abbildung 16: DNMT1 beeinflusst die Genexpression von *Lhx1* durch Veränderungen von H3K27me3.** (A) Quantitative Analyse des *Lhx1* Expressionslevels mittels qPCR an N2a-Zellen nach Kontroll- und *Dnmt1* siRNA-Transfektion, sowie nach Behandlung mit RG108, verglichen zur DMSO-Kontrolle und normalisiert gegen *ActB* und *Rps29*. (B) MeDIP gefolgt von semiquantitativer DNA-Sequenzierung des *Lhx1* Genlocus von FACS-angereicherten *Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1* wildtypischen und *Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1 loxP<sup>2</sup>* Zellen des basalen Telenzephalons von E16 Embryonen. Dargestellt sind Lokalisationen von *Lhx1*-Primerbindungsstellen in Promotor (#1) und Promotor-assoziierten Bereichen (#2), sowie in nicht-regulatorischen Bereich (#3). (C) Geldokumentation der quantitativen Bestimmung des über ChIP mittels H3K27me3-spezifischen Antikörper isolierten DNA-Gehalts der in (B) dargestellten Primerpositionen im Vergleich zwischen Kontroll- und *Dnmt1* siRNA-transfizierten N2a-Zellen. Der Gehalt unspezifisch gebundener DNA ist durch IgG angezeigt. (D) Quantitative PCR nach ChIP mit H3K27me3-spezifischen Antikörper und IgG als Hintergrundkontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse für die in (B) angezeigten Primerpositionen im *Lhx1* Genlocus. Normalisiert wurde auf das eingesetzte DNA-Material jeder Probe (Input; 3 individuelle ChIP-Experimente mit je 4 technischen Replikaten). \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 Studentischer t-Test.

Die bisher dargestellten Ergebnisse lassen somit vermuten, dass die Expression des Transkriptionsfaktors LHX1 durchaus von DNMT1 reguliert werden kann, jedoch - vergleichbar mit *Pak6* - nicht durch direkte Methylierung des Genlocus. Inwieweit eine Reduktion der repressiven Histonmodifizierung H3K27me3 auch für die Regulation des *Lhx1* Expressionsniveaus in Frage kommt, wurde erneut mittels ChIP gefolgt von qPCR in *Dnmt1*- und Kontroll-siRNA-behandelten N2a-Zellen untersucht. Ähnlich wie für *Pak6*, konnte auch für *Lhx1* nach Reduktion des *Dnmt1*-Expressionsniveaus nur ein geringeres Level an H3K27-Trimethylierung am entsprechenden Genpromotor und in der Promotor-flankierenden Region detektiert werden (Abb. 16B-D, #1, #2). Die außerhalb der regulatorischen Genbereiche befindliche Region zeigte nur eine schwache Assoziation mit H3K27me3 und keine Veränderungen zwischen Kontroll- und *Dnmt1* siRNA-behandelten N2a-Zellen (Abb. 16B-D, #3). Sie diente als Kontrolle der Spezifität der in den anderen Primerregionen detektierten Unterschiede. Diese Ergebnisse wurden zum Teil von Christiane Schmidt zur Verfügung gestellt.

Zusammenfassend scheint somit auch für die Regulation der Expression des Transkriptionsfaktors LHX1 nicht-kanonische Funktionen von DNMT1 über Interaktionen mit Histon-modifizierenden Proteinen in Frage zu kommen.

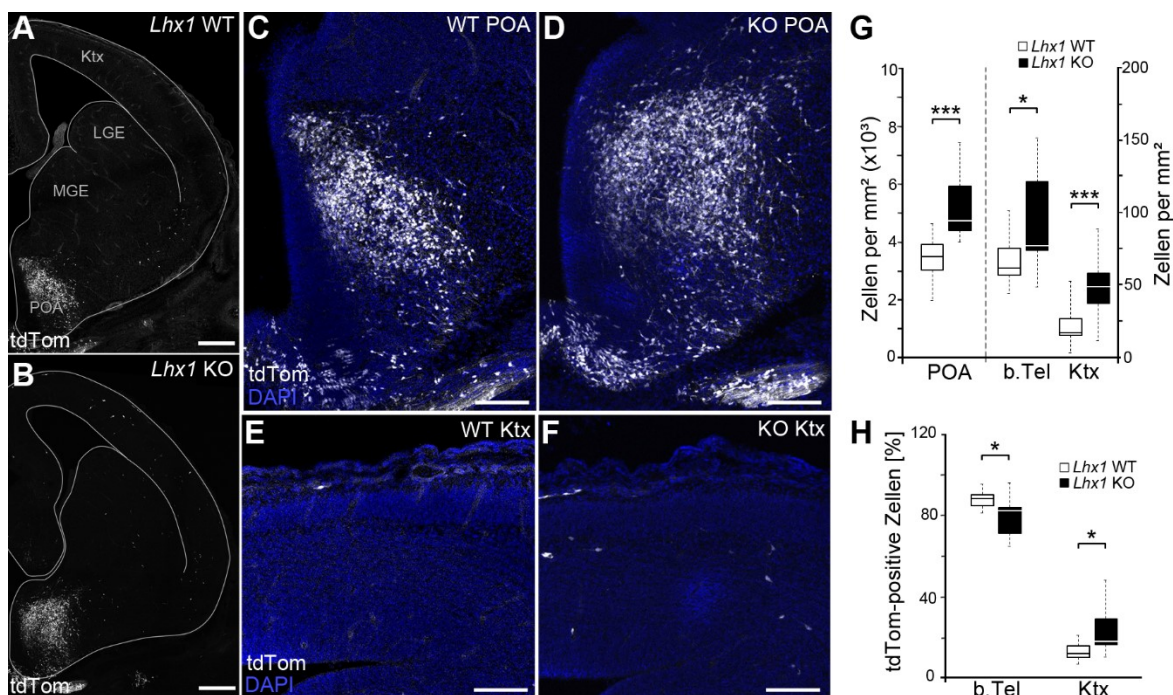
### **5.2.3. LHX1 beeinflusst das Überleben von neuronalen Zellen aus dem POA**

Das Überleben der migrierenden unreifen Interneurone auf ihrem Weg aus dem POA in ihre Zielareale ist von großer Bedeutung und DNMT1 scheint dieses, wie im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt, über die repressive Regulation von *Pak6* in jenen wandernden Zellen entscheidend zu fördern. Verschiedene Studien konnten ebenso unlängst zeigen, dass auch LHX1 die Mortalität verschiedener Zelltypen beeinflusst (Zhao et al., 2007; Dormoy et al., 2011; Kawaue et al., 2012; Bedont et al., 2014; Huang et al., 2014). Zur weiteren Analyse der Rolle des Transkriptionsfaktor wurde *Lhx1* im Rahmen eines konditionalen Mausmodells in post-mitotischen *Hmx3*-exprimierenden Zellen des POA deletiert (*Hmx3-Cre/tdTomato/Lhx1 loxP<sup>2</sup>, Lhx1* Knockout, KO).



### 5.2.3.1. Die postmitotische Deletion von *Lhx1* führt zu einer gesteigerten Anzahl POA-abstammender Interneurone

Um einen ersten Einblick in die Funktionen von LHX1 bei der Entwicklung kortikaler Interneurone zu erlangen, wurden die Anzahl tdTomato-positiver Zellen in dem POA, im basalen Telenzephalon und im Kortex von E16 wildtypischen und *Lhx1* Knockout Tieren quantifiziert (Abb. 17A-F).

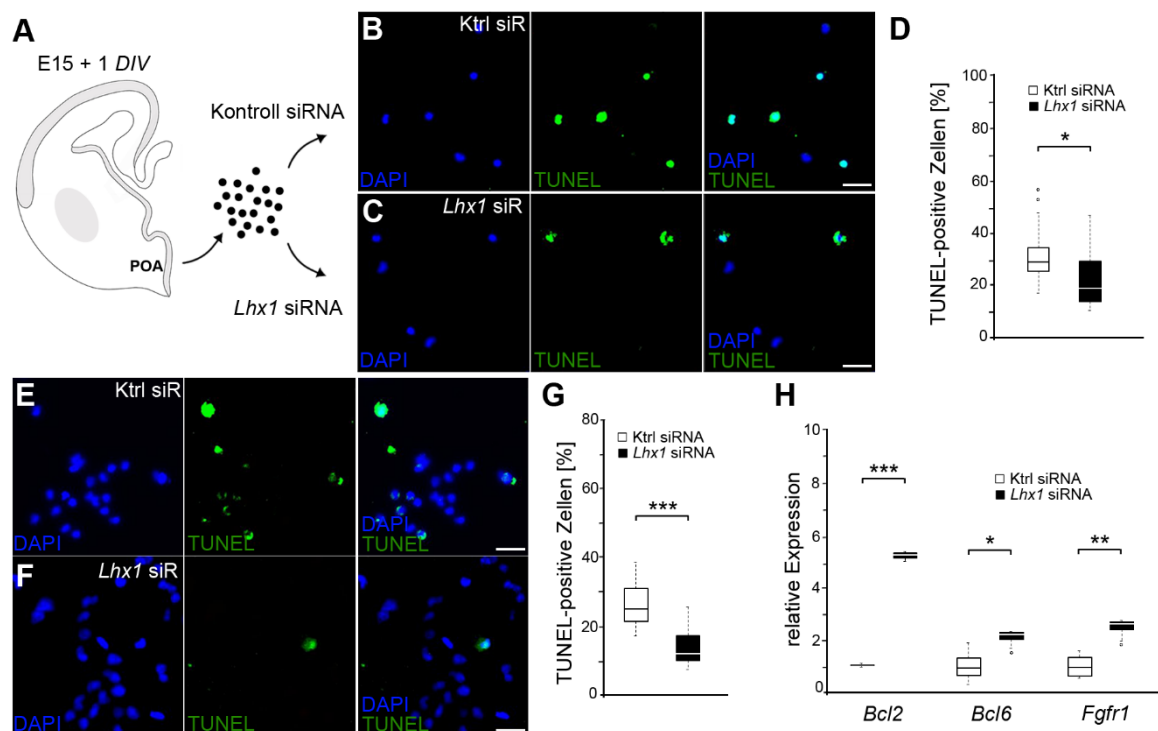


**Abbildung 17: Embryonale *Lhx1* Knockout-Tiere zeigen eine erhöhte Anzahl von Zellen im basalen Telenzephalon und im Kortex.** (A-F) Mikroskopische Aufnahmen *Hmx3-Cre/tdTomato/Lhx1* wildtypischer (A, *Lhx1* WT) und *Hmx3-Cre/tdTomato/Lhx1 loxP2* Tiere (B, *Lhx1* KO), sowie Überlagerungen mit tdTomato (weiß) und DAPI (blau) des POA und dem Kortex von *Lhx1* WT (C, E) und *Lhx1* KO Tieren (D, F) veranschaulichen Anzahl und Lokalisierung der tdTomato-positiven Zellen, quantifiziert in (G) als Zelldichte und in (H) als Verteilung der Zellen (n = 13 Hemisphären für *Lhx1* WT; n = 11 Hemisphären für *Lhx1* KO; jeweils 3 Embryonen pro Genotyp). Maßstabsbalken: 200 µm in (A, B), 50 µm in (C-F). b.Tel, basales Telenzephalon; Ktx, Kortex; LGE, laterale ganglionische Eminenz (GE); MGE, mediale GE; POA, präoptisches Areal.

In allen analysierten Arealen des *Lhx1* KO (POA, basales Telenzephalon und Kortex) konnte hierbei eine erhöhte Zelldichte ermittelt werden (Abb. 17G). Verglichen zum Wildtyp konnte in *Lhx1*-defizienten Tieren darüber hinaus ein erhöhter Anteil migrierender Zellen detektiert werden, die bereits den Kortex erreicht hatten (Abb. 17H). Dies lässt vermuten, dass LHX1 schon embryonal auf die postmitotische Entwicklung *Hmx3*-exprimierender Zellen des POA Einfluss nimmt und insbesondere deren Überleben zu regulieren scheint.



Diese Vermutung wurde durch Untersuchungen der Zelltodrate mittels TUNEL-Assay an *Lhx1* und Kontroll-siRNA-behandelten POA-Einzelzellen *in vitro* bestätigt (Abb. 18A-C). Hierbei zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl überlebender Zellen nach Verringerung des *Lhx1*-Expressionsniveaus (Abb. 18D). Zusammengefasst deuten die erhöhten Zellzahlen im Gehirn von *Lhx1*-defizienten Tieren in Kombination mit der erhöhten Überlebensrate von kultivierten POA-Einzelzellen mit reduziertem *Lhx1*-Niveau auf eine durch LHX1 vermittelte Regulation der Motilität jener Zellen während der Entwicklung hin.



### 5.2.3.2. LHX1 scheint in der Expressionskontrolle von Apoptose-assoziierten Genen involviert zu sein

Vergleichbar mit der erhöhten Überlebensrate von kultivierten POA-Einzelzellen nach Reduktion des *Lhx1* Expressionsniveaus zeigten auch kultivierte *Lhx1* siRNA-behandelte N2a-Zellen eine Verringerung in der Zahl TUNEL-positiver und somit sterbender Zellen (Abb. 18E-G). Darauf aufbauend konnten quantitative RNA-Expressionsanalysen Veränderungen im Expressionsniveau von Apoptose-assoziierten Genen nach siRNA-vermittelter Reduktion der RNA-Expression des Transkriptionsfaktors LHX1 in N2a-Zellen nachweisen (Abb. 18H). So zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Expressionsniveaus der anti-apoptotischen Faktoren *Bcl2* und *Bcl6* nach *Lhx1* siRNA-Behandlung. Die verschiedenen Mitglieder der BCL-2 Familie, zu denen BCL2 und BCL6 gehören, haben kritische Funktionen bei der Regulation von sowohl Caspase-abhängigen als auch -unabhängigen Zelltodsignalwegen in der neuronalen Entwicklung und auch bei pathophysiologischen Zuständen (Merry und Korsmeyer, 1997; Gross et al., 1999; Akhtar et al., 2004). Dabei zeigt vor allem der während der Entwicklung im Nervensystem hoch exprimierte Faktor BCL2 in einer Reihe von Studien protektive Effekte, welche potentiell den Zelltod in verschiedenen neuronalen Zellen verhindern können (Abe-Dohmae et al., 1993; Allsopp et al., 1993; Mah et al., 1993; Martinou et al., 1994; Farlie et al., 1995; Michaelidis et al., 1996).

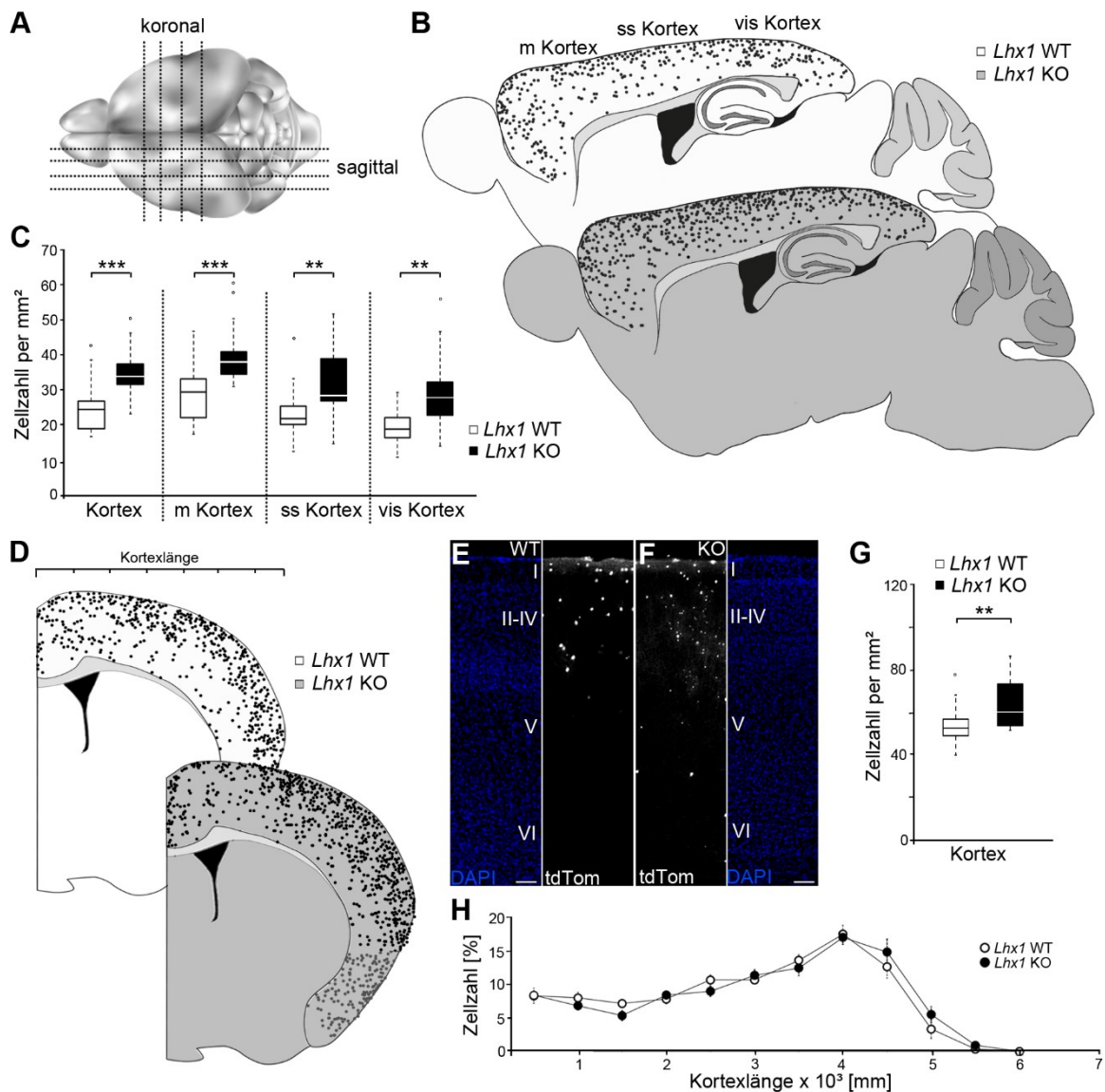
Neben diesen beiden Transkripten, zeigte sich auch *Fgfr1* in *Lhx1*-defizienten N2a-Zellen signifikant erhöht exprimiert (Abb. 18H). *Fgfr1* kodiert für einen Rezeptor des Fibroblasten Wachstumsfaktors (FGF) und konnte bisher vor allem in Krebszellen als anti-apoptotisch wirkend charakterisiert werden (Lefevre et al., 2009; Tomlinson et al., 2009).

Die dargestellten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass LHX1 bei der Regulation des Zelltods während der embryonalen Entwicklung neuronaler Zellen vermutlich über die transkriptionelle Kontrolle von Apoptose-relevanten Genen eine wichtige Funktion einnimmt.

#### 5.2.3.3. Die Deletion von *Lhx1* führt zu einer erhöhten Anzahl an Neuronen im adulten Gehirn

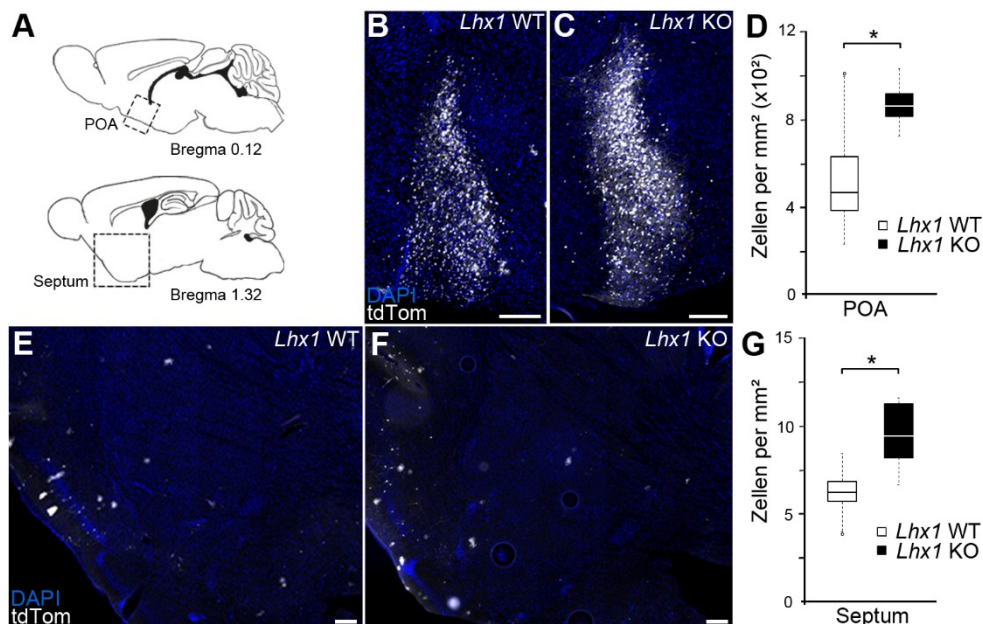
Um zu überprüfen, ob sich die erhöhte embryonale Anzahl POA-abstammender Zellen auch in adulten *Hmx3-Cre/tdTomato/Lhx1 loxP<sup>2</sup>* Tieren manifestiert, wurden umfassende phänotypische Analysen in Zusammenarbeit mit Raghavendra Singaraveni und Vanessa Gölling durchgeführt. Hierbei zeigten auch adulte *Lhx1*-defiziente Mäuse eine signifikant erhöhte Anzahl an tdTomato-positiven Zellen im zerebralen Kortex, analysiert entlang der anterior-posterioren Körperachse in verschiedenen Bregmen sagittaler Hirnschnitte (Abb. 19A-C). Diese signifikant höhere Anzahl an tdTomato-positiven, *Lhx1*-defizienten Zellen konnte in allen untersuchten kortikalen Bereichen, den motorischen (m), somatosensorischen (ss) und auch visuellen (vis) Arealen detektiert werden (Abb. 19B, C). Weitere Analysen an koronalen Hirnschnitten verschiedener Bregmen sollten die Möglichkeit einer differenten Verteilung *Lhx1*-defizienter und wildtypischer Zellen entlang der medial-lateralen Achse und hierbei insbesondere in lateralen Hirnbereichen ausschließen, welche nicht durch die analysierten sagittalen Bregmen abgedeckt wurden (Abb. 19A, D). Neben der auch in der vorangegangenen Analyse ermittelten signifikant erhöhten Anzahl kortikaler tdTomato-exprimierender Zellen im *Lhx1* Knockout (Abb. 19E-G), zeigten sich hinsichtlich der medial-lateralen Verteilung im Kortex keine signifikanten Unterschiede (Abb. 19H). Die Lokalisierung der tdTomato-positiven Zellen scheint somit zwischen *Lhx1*-Knockout und Wildtyp im zerebralen Kortex vergleichbar zu sein, wohingegen die Zellzahl in *Lhx1*-defizienten Mäusen in allen analysierten Hirnarealen deutlich erhöht vorlag.

Wie zuvor erwähnt ist das präoptische Areal nicht nur Ursprung kortikaler Interneurone (Gelman et al., 2009; Kriegstein und Alvarez-Buylla, 2009; Pensold et al., 2016; Laclef und Metin, 2017). Neben einem großen Anteil an residualen Zellen, welche an ihrem Ursprungsort verbleiben, sind POA-abstammende tdTomato-positive Zellen in adulten, wildtypischen Gehirnen unter anderem in septalen Bereichen lokalisiert (Abb. 20A, B, E). Im Vergleich beider Genotypen zeigten sich auch hier signifikant erhöhte Zellzahlen im *Lhx1* Knockout, sowohl in dem POA (Abb. 20C, D) als auch im adulten Septum (Abb. 20F, G). Die Daten hierfür wurden freundlicherweise von Raghavendra Singaraveni zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 19: Die Deletion von *Lhx1* während der Entwicklung führt zu einer reduzierten Zahl POA-abstammender Zellen im adulten Kortex.** (A) Schematische Abbildung eines adulten Mausgehirns und der analysierten sagittalen (B-C) und koronalen (D-H) Schnittebenen entsprechender *Hmx3-Cre/tdTomato/Lhx1* wildtypischer (*Lhx1* WT, hellgrau in B und D) und *Hmx3-Cre/tdTomato/Lhx1 loxP<sup>2</sup>* Tiere (*Lhx1* KO, dunkelgrau in B und D). (B, C) Darstellung der Zellanzahl und Verteilung in Schemen repräsentativer, sagittaler Schnitte mit Bregmen zwischen 1.44 - 1.92, sowohl im gesamten Kortex, als auch in den einzelnen kortikalen Bereichen (B; m Ktx, ss Ktx und vis Ktx), quantifiziert in (C) (n = 16 Schnitte für *Lhx1* WT, n = 15 Schnitte für *Lhx1* KO; je 3 Gehirne pro Genotyp). (D-F) Die lateral-mediale Anzahl und Verteilung kortikaler tdTomato-positiver Zellen dargestellt in schematischen Abbildern koronaler Hirnschnitte (D), sowie in kortikalen Ausschnitten mikroskopischer Überlagerungen von *Lhx1* WT (E) und *Lhx1* KO-Tieren (F) mit DAPI (blau) und tdTomato (weiß). (G, H) Quantifikation der Zelldichte in (G) und prozentualen Verteilung entlang der lateral-medialen Länge in H (dargestellt als „Kortexlänge“ in D; n = 16 Hemisphären für *Lhx1* WT; n = 14 Hemisphären für *Lhx1* KO; analysierte Bregmen zwischen 3.34 - 4.78; 3 Gehirne pro Genotyp; P = 0,78; one-way Anova-Test). \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 Studentischer t-Test. Maßstabsbalken: 20 µm in (E, F). m, motorisch; ss, somato-sensorisch; vis, visuell.

Zusammenfassend lässt dies die Aussage zu, dass der an Entwicklungsstadien detektierte Anstieg in der Anzahl POA-abstammender Zellen der *Hmx3*-Linie nach Deletion von *Lhx1* nicht nur von transienter Natur ist, sondern sich auch in adulten Tieren und in allen Zielgebieten POA-abstammender Zellen zeigte. Neben PAK6 scheint mit dem Transkriptionsfaktor LHX1 somit ein weiterer Zelltod-regulierender Faktor durch DNMT1 als eine Art übergeordnete Instanz in seiner areal- und zellspezifischen Expression koordiniert zu werden, was erneut das große Potential und die Wichtigkeit epigenetischer Regulationsmechanismen während der Entwicklung herausstellt.



**Abbildung 20: Das POA und das Septum adulter Tiere zeigen ebenso eine erhöhte Zellzahl im *Lhx1* Knockout.** (A) Schematische, sagittale Hirnschnitte adulter Tiere zeigen Bereiche des POA (Bregma - Interaural 0.12; schwarze Rahmen) und des Septums (Bregma - Interaural 1.32; schwarzer Rahmen). (B-G) Mikroskopische Überlagerungen zur Darstellung der Zellzahl in POA (B, C) und Septum (E, F) adulter *Hmx3-Cre/tdTomato/Lhx1* wildtypischer (B, E; *Lhx1* WT) und *Hmx3-Cre/tdTomato/Lhx1 loxP²* Tiere (C, F; *Lhx1* KO) mit tdTomato (weiß) und DAPI (blau), quantifiziert in (D) für das POA (n = 7 Schnitte für *Lhx1* WT, n = 6 Schnitte für *Lhx1* KO; Sagittalschnitte der Bregmen 0.12-0.36; 3 Gehirne je Genotyp) und in (G) für das Septum (n = 5 Schnitte für *Lhx1* WT, n = 9 Schnitte für *Lhx1* KO; Sagittalschnitte der Bregmen 1.44-1.92; 3 Gehirne je Genotyp). \*p < 0,05; Studentscher t-Test. Maßstabsbalken: 100 µm in (B, C, D, E). POA, präoptische Areal.

#### 5.2.4. LHX1 beeinflusst die Kortex-gerichtete tangentielle Migration POA-abstammender Zellen

Interessanterweise wurden ähnlich wie für PAK6, auch für LHX1 regulatorische Funktionen hinsichtlich der Steuerung von Migrationsprozessen bereits beschrieben (Palmesino et al., 2010; Pensold et al., 2016). Darüber hinaus konnten für den in MGE-abstammenden Interneuronen exprimierten Transkriptionsfaktor LHX6 ebenfalls essentielle Funktionen in der Lenkung jener Zellen während ihrer tangentialen Migration in den Kortex aufgezeigt werden (Alifragis et al., 2004; Liodis et al., 2007). Ob LHX1 somit für die tangentielle Migration und laminare Verteilung von POA-abstammenden kortikalen Interneuronen relevant ist, sollten weitere Untersuchungen adressieren.

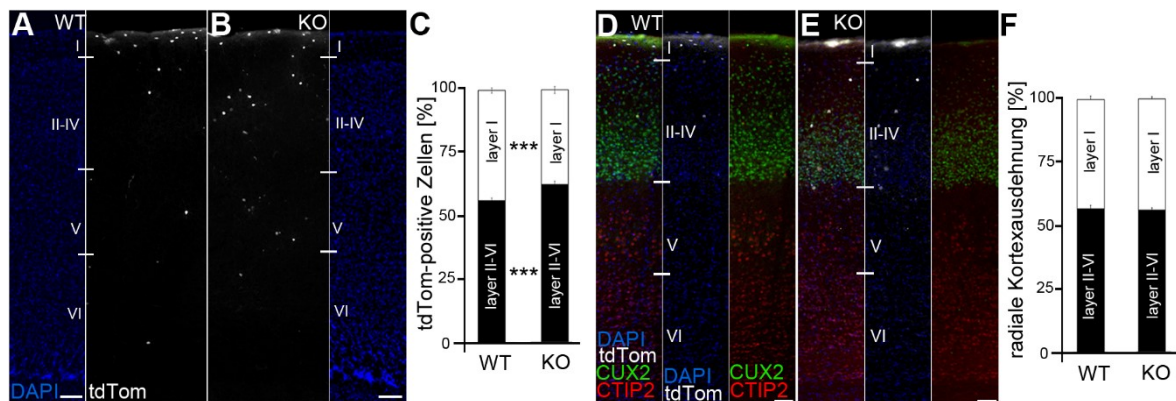
##### 5.2.4.1. Die Deletion von *Lhx1* führt zu einer teilweisen Fehlpositionierung von POA-abstammenden Zellen im adulten Kortex

Bei der Analyse der kortikalen Verteilung von tdTomato-positiven Zellen in adulten, wildtypischen und *Lhx1* Knockout-Gehirnen fiel auf, dass *Lhx1*-defiziente Zellen signifikant weniger häufig in der superfiziellen Schicht I des Kortex lokalisiert waren (Abb. 21A-C). Im Rahmen detaillierter schichten-spezifischer Analysen sagittaler Hirnschnitte adulter Mäuse zeigte sich im Wildtyp mit  $58,3 \% \pm 2,3$  ein relativ großer Anteil an Zellen in der flächenmäßig kleinen superfiziellen Schicht I (Abb. 21A, C). Wohingegen zusammengefasst  $41,7 \% \pm 1,3$  der tdTomato-exprimierenden Zellen in den darunter gelegenen Schichten II-VI lokalisiert waren. Im *Lhx1* Knockout kam es zu einer signifikanten Verschiebung in Richtung der Schichten II-VI ( $65,5 \% \pm 1,5$ ), wohingegen in der Schicht I mit  $37,5 \% \pm 2,3$  signifikant weniger tdTomato-positive Zellen verglichen zum *Lhx1* Wildtyp detektiert werden konnten (Abb. 21B, C). Die Daten wurden zum Teil von Raghavendra Singaraveni erhoben.

Um auszuschließen, dass veränderte Schichtendicken ursächlich für die fehllokalisierten *Lhx1*-defizienten Zellen sind, wurden zusätzlich zur Klassifizierung anhand der Zelldichte mittels Kernmarkierung (DAPI) auch immunohistochemische Markierungen von CUX2 und CTIP2 zur Identifizierung der Schichten durchgeführt (Abb. 21D, E).



CUX2 wird vor allem in den kortikalen Schichten I-IV exprimiert, wohingegen CTIP2 in den tieferen Schichten V-VI detektierbar ist (Nieto et al., 2004; Nikouei et al., 2016). Zwischen wildtypischen und *Lhx1* Knockout-Kortizes waren alle Schichten isoform ausgebildet (Abb. 21F), so dass sich die Verschiebung der Zellen in Richtung ventrikelnaher Bereiche auf eine durch die Deletion von *Lhx1* verursachte fehlerhafte Lokalisation zusammenfassen lässt.



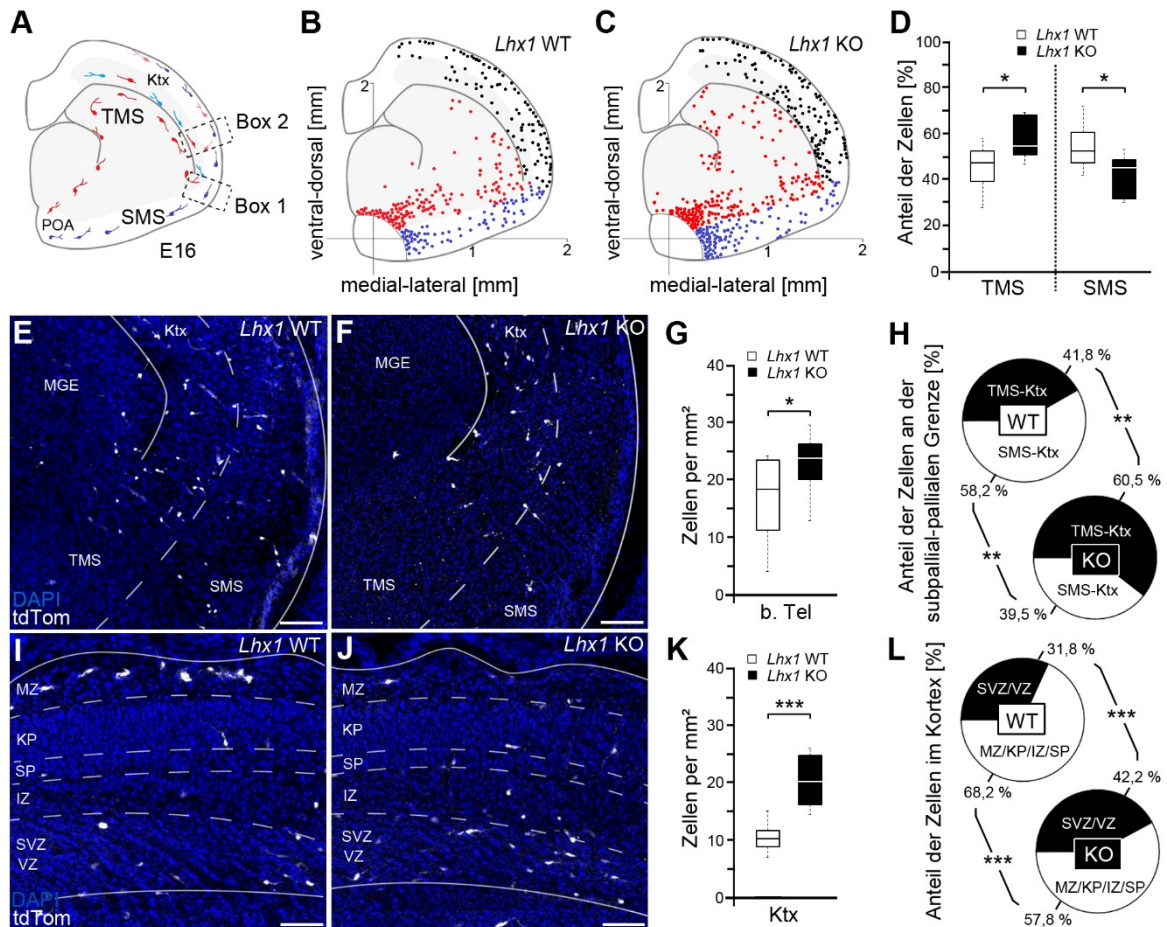
**Abbildung 21: POA-abstammende *Lhx1*-defiziente Zellen sind im adulten Kortex vermehrt in ventrikelnahen Schichten lokalisiert.** (A-C) Darstellung der Zellzahl und Schichten-spezifischen Verteilung tdTomato-positiver Zellen in Ausschnitten mikroskopischer Überlagerungen repräsentativer sagittaler Hirnschnitte von adulten *Hmx3-Cre/tdTomato/Lhx1* wildtypischen (A, *Lhx1* WT) und *Hmx3-Cre/tdTomato/Lhx1 loxP2* Tieren (B, *Lhx1* KO) mit tdTomato (weiß) und DAPI (blau), quantifiziert in C (n = 16 Schnitte für *Lhx1* WT, n = 15 Schnitte für *Lhx1* KO; analysierte Bregmen 1.44-1.92, 3 Gehirne pro Genotyp). (D-F) Ausdehnung kortikaler Schichten in adulten *Lhx1* WT (D) und *Lhx1* KO-Tieren (E), gezeigt in Ausschnitten repräsentativer mikroskopische Überlagerungen mit tdTomato (weiß), CUX2 (grün), CTIP2 (rot) und DAPI (blau). Das Verhältnis der oberen (Schichten I-IV, CUX2-positive Zellen) zu unteren Schichten (V-VI, CTIP2-positive Zellen) ist in (F) quantifiziert (n = 15 Ausschnitte für *Lhx1* WT, n = 12 Ausschnitte für *Lhx1* KO; je 3 Ausschnitte aus einer Hemisphäre; 3 Gehirne pro Genotyp; P = 0,62; Studentischer t-Test). \*\*\*p < 0,001 Studentischer t-Test.

#### 5.2.4.2. Die Lenkung migrierender POA-abstammender Neurone wird durch LHX1 reguliert

Fehllokalisierte Zellen im Kortex adulter Stadien können auf Defekte während der tangentialen Migration basieren (Alifragis et al., 2004; Liodis et al., 2007). Weitere Studien an E16 sollten somit den Einfluss von LHX1 auf das Migrationsverhalten der POA-abstammenden Zellen untersuchen.

Verschiedene Studien konnten bereits herausstellen, dass Zellen aus dem präoptischen Areal bevorzugt entlang des superfiziellen Migrationsstroms (SMS) in Richtung Kortex gelenkt werden, wohingegen Interneurone aus der MGE zum größten Teil entlang des ventrikelnahen tiefen migratorischen Pfades (TMS) migrieren (Zimmer et al., 2011; Guo und Anton, 2014).

Zellen der *Hmx3*-positiven Population wanderten an E16 nicht ausschließlich entlang des SMS in den Kortex, ungefähr  $45,2 \% \pm 4,0$  der Zellen sind im tiefen Migrationsweg zu finden (Abb. 22A, B, D; Gelmann et al., 2009). Interessanterweise konnte in entsprechenden *Lhx1* Knockout-Tieren mit  $57,8 \% \pm 3,4$  ein signifikant erhöhter Anteil tief migrierender, tdTomato-positiver Zellen ermittelt werden (Abb. 22C, D).



**Abbildung 22: Embryonale, *Lhx1*-defiziente POA-Zellen zeigen ein verändertes tangentes Migrationsverhalten.** (A) Schematische Darstellung der Migration POA-abstammender Zellen entlang des superfiziellen (SMS; blaue Zellen) und tiefen (DMS; rote Zellen) migratorischen Stroms in Richtung Kortex an E16, sowie typischer Migrationswege im Kortex mit SMS- (blau) und DMS-Zellen (rosa) in der Marginalzone und DMS- (rot) und SMS-Zellen (türkis) in der Subventrikular-/Ventrikularzone. Schwarze Umrundungen zeigen Bereiche des subpallialen-pallialen Übergangs (Box 1) und des Kortex (Box 2). (B, C) Schematische Darstellung der Zellzahl und Lokalisierung von E16 *Hmx3-Cre/tdTomato/Lhx1* wildtypischen (B, *Lhx1* WT) und *Hmx3-Cre/tdTomato/Lhx1 loxP2* Embryonen (C, *Lhx1* KO) mit farbkodierten Zellen im basalen Telenzephalon (blau = SMS-Zellen; rot = DMS-Zellen) und im Kortex (schwarz). (D) Quantifizierung des Anteils tdTomato-positiver Zellen in den entsprechenden Migrationsströmen ( $n = 7$  Hemisphären für *Lhx1* WT;  $n = 8$  Hemisphären für *Lhx1* KO; je 3 Gehirne pro Genotyp). (E-L) Zellzahl und -verteilung entlang der subpallialen-pallialen Grenze (E-H; Box 1 in A) und dem Kortex (I-L; Box 2 in A), dargestellt in Ausschnitten mikroskopischer Überlagerungen von E16 *Lhx1* WT (E, I) und *Lhx1* KO-Tieren (F, J) mit tdTomato (weiß) und DAPI (weiß). Die Zellzahl an der subpallialen-pallialen Grenze (G) und im Kortex (K), sowie die Verteilung tdTomato-positiver Zellen zwischen superfiziell (SMS-Ktx) und tief (TMS-Ktx) in den Kortex migrierende Zellen (H) und der Zellverteilung in den kortikalen transienten Zonen (L) wurden quantifiziert ( $n = 13$  Hemisphären für *Lhx1* WT;  $n = 10$  Hemisphären für *Lhx1* KO; 3 Gehirne je Genotyp). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  Studentischer t-Test. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m in (E, F) 25 $\mu$ m in (I, J); IZ, Intermediärzone; KP, Kortikale Platte; Ktx, Kortex; MGE; mediale ganglionische Eminenz; MZ, Marginalzone; POA, präoptisches Areal; SP, Subplatte; SMS, superfizieller Migrationsstrom; SVZ, Subventrikularzone; TMS, tiefer Migrationsstrom; VZ, Ventrikularzone.



LHX1 scheint somit für die adäquate Migration POA-abstammender Zellen entlang der spezifischen Routen regulatorisch wichtige Funktionen einzunehmen, welche nach Deletion zu einer fehlerhaften Lenkung dieser Zellen führt.

Weitere Analysen zeigten auch hinsichtlich der Zellverteilung an der subpallial-pallialen Grenze und im sich entwickelnden Kortex Unterschiede zwischen embryonalen wildtypischen und *Lhx1* Knockout-Tieren (Abb. E22A, E-L). Neben der auch zuvor beobachteten allgemein erhöhten Zellzahl in beiden Bereichen (Abb. E22G, K), befanden sich *Lhx1*-defiziente Zellen in dem Übergangsareal zwischen basalem Telenzephalon und Kortex zu einem erhöhten prozentualen Anteil in den tieferen ventrikelnäheren Bereichen (Abb. 22 Box 1 in A, E-H). Darüber hinaus zeigten zonenspezifische Untersuchungen des sich entwickelnden Kortex einen signifikant erhöhten Anteil *Lhx1*-defizienter Zellen in der Ventrikular- (VZ) und Subventrikularzone (SVZ; Abb. 22 Box 2 in A, I-L).

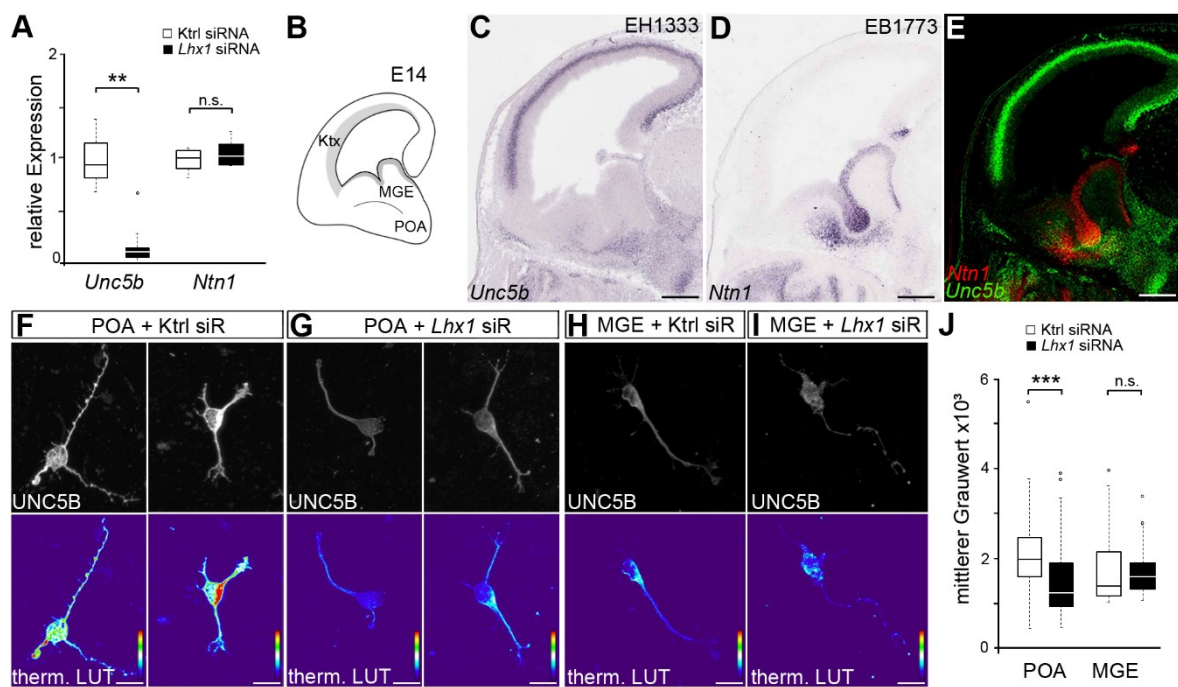
Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung von LHX1 in der Lenkung POA-abstammender Zellen, sowohl während ihrer Wanderung durch das basale Telenzephalon, als auch im sich ausbildenden Neokortex, ähnlich wie dies für LHX6 in der Regulation von MGE-abstammenden Zellen gezeigt werden konnte (Alifragis et al., 2004; Liodis et al., 2007).

#### 5.2.4.3. LHX1 bedingt die Expression spezifischer Lenkungsfaktoren

Die koordinierte und zielgerichtete Migration während der postmitotischen Entwicklung unreifer Interneurone ist zu einem entscheidenden Anteil abhängig vom exprimierten Rezeptorrepertoire einer jeden Zelle (Marin und Rubenstein, 2003; Metin et al., 2006; Hernandez-Miranda et al., 2010; Guo und Anton, 2014; Laclef und Metin, 2017).

Der Netrin-Rezeptor UNC5B reguliert zum Beispiel Migrationsprozesse kortikaler MGE-abstammender Interneurone (van den Berghe et al., 2013) und konnte auch in POA-abstammenden Zellen der *Hmx3*-Population detektiert werden, wie Transkriptomanalysen von E16 FACS-angereicherten *Hmx3-Cre/tdTomato* Zellen aufzeigten (Tab. 10 Anhang). Im Rahmen quantitativer Untersuchungen der Expressionslevel verschiedener typischer Lenkungsrezeptoren in N2a-Zellen mittels qPCR konnte nach *Lhx1* siRNA-Behandlung eine verringerte Expression von *Unc5b* detektiert werden (Abb. 23A). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass

UNC5B nach Bindung seines sezernierten Liganden Netrin-1 (NTN1) repulsive Mechanismen in der Zellmigration vermittelt, jedoch in Abwesenheit pro-apoptotische Signalwege induziert (Llambi et al., 2001; Mehlen und Llambi, 2005; Moore et al., 2007). Sowohl in Kontroll- als auch *Lhx1* siRNA-behandelten N2a-Zellen war *Ntn1* unverändert exprimiert (Abb. 23A), sodass sich weitere Untersuchungen auf eine mögliche durch LHX1 vermittelte Lenkung jener POA-abstammenden Zellen über die regulierte Expression des UNC5B Rezeptor fokussierten.



**Abbildung 23: LHX1 steuert die Migration von POA-abstammenden Zellen möglicherweise durch Regulation der UNC5B Rezeptorexpression.** (A, B) Quantitative RNA-Expressionanalysen von *Unc5b* (A) und *Ntn1* (B) mittels qPCR von Kontroll- und *Lhx1* siRNA-transfizierten N2a-Zellen, normalisiert gegen *ActB* und *Rps29*. (C) Schematische Darstellung eines sagittalen Hirnschnittes an E14. (D, E) *In-situ* Hybridisierungen mit spezifischen RNA-Sonden für *Unc5b* (D; genepaint.org, EB1333) und *Ntn1* (E; genepaint.org, EB1773) an anatomisch vergleichbaren, sagittalen Hirnschnitten von E14 C57BL/6 Mäusen. (F) Die Überlagerung der farbkodierten RNA von *Unc5b* (grün; genepaint.org, EH1333) und *Ntn1* (rot; genepaint.org, EB1773) verdeutlicht deren separierte Lokalisation, sowie überlappende Expressionsareale in sagittalen E14 Hirnschnitten. (G-J) Analyse der UNC5B Expression in E16 (+1 DIV) kultivierten POA- (F, G) und MGE-Einzelzellen (H, I) nach Kontroll- (F, H) und *Lhx1* siRNA-Transfektion (G, I), dargestellt in mikroskopischen Aufnahmen der Fluoreszenzintensität exemplarischer Einzelzellen in schwarz-weiß und als thermale Farbkodierung (therm. LUT), quantifiziert als mittlerer Grauwert (J; n = 73 POA-Zellen für Kontroll-siRNA; n = 69 POA-Zellen für *Lhx1* siRNA; n = 15 MGE-Zellen für Kontroll-siRNA; n = 15 MGE-Zellen für *Lhx1* siRNA; je 3 Embryonen). \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 Studentischer t-Test. Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m in (D-F); 10  $\mu$ m in (G-J). Ktx, Kortex; MGE, mediale ganglionische Eminenz; POA, präoptisches Areal.

*Unc5b* wird embryonal verstärkt, aber nicht ausschließlich in Zellen des POA, in superfiziellen Arealen des basalen Telenzephalons, sowie in der Intermediärzone (IZ) des sich entwickelnden Kortex exprimiert (Abb. 23C; [genepaint.org](http://genepaint.org), EH1333). Zellen der subpallialen Ventrikularzone insbesondere in der MGE und auch Zellen der ventralen striatalen Anlage exprimieren hingegen *Ntn1* (Abb. 23D; [genepaint.org](http://genepaint.org), EH1773), welches als Protein in den Extrazellularraum freigesetzt wird (Moore et al., 2007). Die größtenteils konträre Expression von *Unc5b* und *Ntn1* im basalen Telenzephalon zeigte sich an Überlagerungen von *in situ* Hybrisierungsdaten (Abb. 23E). Diese könnte, aufgrund der repulsiven Interaktion mit in medialeren subpallialen Bereichen freigesetztem NTN1, durchaus eine Rolle in der bevorzugten Migration POA-abstammender Zellen entlang des superfiziellen Weges spielen.

Diese Hypothese unterstützten Fluoreszenzintensitätsmessungen von immun-histochemisch markiertem UNC5B an E16 (+1DIV) POA-Einzelzellen nach *Lhx1* und Kontroll-siRNA-Behandlung, durchgeführt von Vanessa Gölling (Abb. 23F, G). Hierbei zeigte sich nach Reduktion des *Lhx1*-Niveaus eine signifikante Verringerung in den detektierten Fluoreszenzintensitäten von UNC5B (Abb. 23J), was auf eine reduzierte Expression des Proteins hindeutet. Ein reduziertes Level des Rezeptors UNC5B könnte eine geringere repulsive Wirkung des medialen Subpallium auf die migrierenden Zellen aus dem POA zur Folge haben, was eine Erklärung für eine erhöhte Anzahl tief lokalisierter Zellen im *Lhx1* Knockout an E16 bietet. Zur Validierung der Spezifität des Experiments, wurden auch MGE-Einzelzellen transfiziert und kultiviert (Abb. 23H, I), welche *Lhx1* und auch *Unc5b* nicht oder nur gering exprimieren (Abb. 23C; Pensold et al. 2016). *Lhx1* siRNA-behandelte MGE-Zellen zeigten wie erwartet, keine Veränderungen der UNC5B Expression nach Reduktion des *Lhx1* Levels (Abb. 24J).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass LHX1 neben seiner Funktion bei der Regulation des Zellüberlebens, auch die Lenkung von POA-abstammenden Zellen entlang ihrer tangentialen Migration in entsprechende kortikale Areale entscheidend beeinflusst und die Expression von spezifischen Rezeptoren wie UNC5B regulieren kann. Dabei impliziert die durch LHX1 vermittelte Regulation von möglichen Lenkungsfaktoren durchaus eine wichtige Rolle des Transkriptionsfaktors in unreifen Interneuronen aus der POA, auch wenn er potentiell einer DNMT1 Repression unterliegt.

Alles in Allem zeigen die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse, dass die DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) die Expression verschiedener Gene reguliert, was für die postmitotische Entwicklung kortikaler POA-abstammender Interneurone essentiell ist. Dabei unterstreichen die vorliegenden Daten die Relevanz des Enzyms bei der Expressionsregulation durch nicht-kanonische Mechanismen über Veränderung von spezifischen Histonmodifikationen. Zu denen in dieser Arbeit herausgestellten, von DNMT1 methylierungsunabhängig regulierten Genen gehören jene, die für die Serin/Threonin-Proteinkinase PAK6 und für den LIM-HD-Transkriptionsfaktor LHX1 kodieren. Beide Proteine haben nicht nur großen Einfluss auf das Überleben, sondern auch auf die Migration kortikaler Interneurone in entsprechende Zielareale. Es ist darüber hinaus mehr als wahrscheinlich, dass auch weitere wichtige Gene durch DNMT1 reguliert werden. Dies bietet interessante Perspektiven, insbesondere im Hinblick auf krankheits-assoziierte Studien von potentiellen Kandidaten.

## 6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) bei der Regulation der postmitotischen Entwicklung von kortikalen POA-abstammenden Interneuronen untersucht. Diese umfasst die Migration von ihrem subpallialen Ursprungsort in den Kortex, sowie die Ausbildung zelltypischer Charakteristika an ihren kortikalen Zielpositionen (Wamsley und Fishell, 2017). Jene Prozesse unterliegen einer strengen und komplexen genetischen Kontrolle (Flames und Marin, 2005; Flames et al., 2007; Gelman und Marin, 2010). Als epigenetischer Regulationsfaktor kann DNMT1 die Aktivität einer Vielzahl von Genen beeinflussen (Moore et al., 2013). Neben der Identifikation von potenziellen untergeordneten Zielgenen und deren Regulationsmechanismen, stand die Aufklärung der zellulären Funktionen relevanter DNMT1-regulierter Gene im Fokus der vorliegenden Arbeit.

Im ersten Abschnitt konnte mit Hilfe eines konditionalen *Dnmt1* Knockout-Mausmodells (*Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1 loxP<sup>2</sup>*) gezeigt werden, dass DNMT1 die Expression von *Pak6* in unreifen POA-abstammenden Interneuronen reprimiert. Funktionelle *in vitro* Studien verdeutlichten, dass diese Repression sich als entscheidend für ihre Überlebenswahrscheinlichkeit und die Aufrechterhaltung ihrer Migrationskapazität während der Wanderung durch das basale Telenzephalon erwies. Im zweiten Abschnitt konnte der Transkriptionsfaktor LHX1 identifiziert werden, welcher ebenfalls durch DNMT1 in seiner Genaktivität beeinflusst wird. Umfassende Analysen des konditionalen Knockout von *Lhx1* in Zellen aus dem POA (*Hmx3-Cre/tdTomato/Lhx1 loxP<sup>2</sup>*), sowie weitere *in vitro* Untersuchungen, verdeutlichten dabei seine Relevanz für das Überleben und die Lenkung ihrer tangentialen Migration.

Überraschenderweise deuteten Untersuchungen hinsichtlich der DNMT1-abhängigen Regulation beider Gene auf einen von der DNA-Methylierung unabhängigen Mechanismus hin. Es stellte sich eine differente Ausbildung der repressiven Histonmodifizierung H3K427me3 in Abhängigkeit von der Interaktion zwischen DNMT1 und der Histonmethyltransferase EZH2 als potentieller Regulationsweg heraus. Die dargestellten Ergebnisse unterstützen somit ebenfalls die Wichtigkeit der Vernetzung von DNMT1 und der DNA-Methylierung mit

repressiven Histonmodifikationen zur Expressionskontrolle während der postmitotischen Entwicklung kortikaler Interneurone.

### **6.1. DNMT1 reprimierte Reife- und Zelltod-assoziierte Gene in migrierenden Interneuronen aus dem präoptischen Areal**

Im Rahmen Einzelzell-basierter Analysen, sowie immunhistochemischer Färbungen konnten wir DNMT1 erstmalig in postmitotischen, jedoch unreifen Interneuronen aus dem POA nachweisen (Pensold et al., 2016). Die bisher überwiegend postulierte Funktion von DNMT1 liegt in der Methylierung von Cytosinen des hemimethylierten DNA-Stranges nach der mitotischen Zellteilung (Li et al., 1992; Pradhan et al., 1999; Fatemi et al., 2001; Hermann et al., 2004; Svedruzic, 2011). Jedoch konnten verschiedene Studien bereits die Relevanz dieser DNA-Methyltransferase für nachfolgende neuronale Differenzierungs- und Reifungsprozesse, sowie für die Funktionalität von adulten Neuronen aufzeigen (Feng und Fan, 2009; Feng et al., 2010; Rhee et al., 2012; Noguchi et al., 2015). Welche Rolle DNMT1 bei der Entwicklung kortikaler POA-entstammender Interneurone hat, wurde in der vorliegenden Arbeit anhand eines konditionalen Mausmodells untersucht. In diesem wurde *Dnmt1* in *Hmx3*-exprimierenden Zellen des präoptischen Areals deletiert.

Die Expression von *Hmx3* wird erst mit dem Ende der mitotischen Phase in POA-Zellen initiiert (Gelman et al., 2009), sodass in Vorläuferzellen die Funktionen von DNMT1 nicht beeinträchtigt sind. In FACS-angereicherten postmitotischen POA-Zellen des Entwicklungstages (E)16 konnte nach Deletion von *Dnmt1* keine entsprechende RNA der Methyltransferase detektiert werden (Pensold et al., 2016). Die mittlere Halbwertszeit von DNMT1 ist abhängig vom jeweiligen Zelltyp und auch von Proteinmodifikationen (Teubner und Schulz, 1995; Agoston et al., 2005; Butler et al., 2009; Esteve et al., 2009). In postmitotischen Neuronen konnte sie bislang auf circa 1,5 Stunden für RNA-Sequenzen und 4,5 Stunden für das entsprechende Protein festgelegt werden, was für einen schnellen Proteinumsatz beziehungsweise -abbau spricht (Teubner und Schulz, 1995; Fan et al., 2001). Dies erlaubte detaillierte Untersuchungen zur Funktion von DNMT1 an Embryonalstadien der *Hmx3*-Expressionsinduzierten Knockout-Mauslinie und ermöglichte einen Einblick in dessen Rolle bei der postmitotischen Entwicklung von POA-abstammenden Interneuronen.

Vergleichende Methylom- und Transkriptomanalysen von embryonalen wildtypischen und *Dnmt1*-defizienten Zellen zeigten ein verringertes globales DNA-Methylierungslevel im *Dnmt1* Knockout (Pensold et al., 2016). Dies deckt sich mit Ergebnissen anderer Studien, welche nach Deletion von *Dnmt1* eine vergleichbare Reduktion der DNA-Methylierung herausstellten (Hutnick et al., 2009; Rhee et al., 2012). Weiterhin zeigten im *Dnmt1* Knockout eine Vielzahl von reduziert methylierten Genen eine signifikant erhöhte Expression (Pensold et al., 2016). Das bestätigt die allgemeine Funktionalität von DNMT1 in der Repression der Genaktivität durch DNA-Methylierung (Jang et al., 2017).

Genontologische Analysen zeigten in wildtypischen Zellen eine prominente Expression von Migrations- und Motilitätsassoziierten Genen (Pensold et al., 2016), welche vermutlich die Wanderung jener Zellen in den Kortex ermöglichen. In *Dnmt1*-defizienten Zellen hingegen lagen vor allem Gene reduziert methyliert und erhöht exprimiert vor, die mit der Funktionalität adulter Neurone assoziiert sind (Pensold et al., 2016). Weiterhin konnten auch erhöhte Transkriptlevel von Zelltod-assoziierten Genen ermittelt werden (Pensold et al., 2016).

Die Ergebnisse der Methylom- und Transkriptomanalysen legen somit nah, dass DNMT1 eine wichtige Funktion bei der Expressionskontrolle von Genen einnimmt, die entscheidende Prozesse in der Entwicklung von Interneuronen regulieren. Zu diesen gehören neben der adäquaten Migration in kortikalen Zielareale insbesondere das Überleben während der verlängerten postmitotischen Entwicklungsphase.

## **6.2. Das Überleben unreifer Interneurone wird durch DNMT1 gesichert**

Während der Entwicklung kortikaler Interneurone sichern sowohl zellinterne Mechanismen als auch Signale aus der Umgebung ihre zelluläre Integrität und ihr Überleben, vor allem während der Migration vom Entstehungsort in den Kortex (Buss et al., 2006; Oswald et al., 2008; Southwell et al., 2012; Tuncdemir et al., 2015). Fehllokalisation und andere zellulären Defekte können hingegen Apoptose-Programme auslösen und zum Zelltod führen (Uribe und Wix, 2012).

DNMT1 scheint für das Überleben unreifer Interneurone aus dem präoptischen Areal eine entscheidende regulatorische Rolle einzunehmen, wie aus den

Methylom- und Transkriptomanalysen hervorging. Diese Annahme unterstützend führte die konditionale Deletion von *Dnmt1* in *Hmx3*-exprimierenden POA-Zellen schon während der Embryonalentwicklung zu einer reduzierten Anzahl jener Zellen im Kortex (Abb. 7). Vergleichbar konnte diese Reduktion auch am frühen postnatalen Stadium P0 und in adulten *Dnmt1* Knockout-Tieren detektiert werden (Abb. 10; (Pensold et al., 2016)).

Eine Vielzahl von Studien konnte bereits zeigen, dass DNMT1 Zelltod-regulierende Funktionen in Neuronen hat (Fan et al., 2001; Hutnick et al., 2009; Rhee et al., 2012; Noguchi et al., 2015). So verursachte eine verminderte Funktionalität von DNMT1 in embryonalen exzitatorischen Neuronen des Neokortex eine erhöhte Mortalität jener Zellen (Hutnick et al., 2009). Dies resultierte in einer verminderten Kortexdicke (Hutnick et al., 2009). Darüber hinaus zeigten sich nach *Dnmt1*-Deletion ähnlich erhöhte Zelltodraten auch in Projektionsneuronen des Hippocampus (Hutnick et al., 2009), sowie in Photorezeptoren und anderen Neuronentypen der postnatalen Retina (Rhee et al., 2012). Rhee und Kollegen (2012) deuteten hierbei in postnatalen Studien erstmals auch auf ein erhöhtes Zellsterben von retinalen Interneuronen im Zusammenhang mit einer verminderten *Dnmt1*-Expression hin.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass DNMT1 das Überleben kortikaler POA-abstammender Interneurone vor allem während ihrer tangentialen Migration positiv reguliert. Darauf deuten erhöhte Mortalitätsraten *Dnmt1*-defizienter POA-abstammende Zellen, die sich am postnatalen Stadium P0 im basalen Telenzephalon befanden (Abb. 10). Desweiteren zeigen Zeitrafferaufnahmen an organotypischen Hirnschnittkulturen an E16 ein erhöhtes Auftreten von Zellkörperfragmentierungen in den durch das Subpallium migrierenden Zellen des *Dnmt1* Knockouts (Abb. 9H, Film 1-4). Eine intensive Fragmentierung steht im Zusammenhang mit einer höheren Mortalitätswahrscheinlichkeit der entsprechenden Zellen (Kerr et al., 1972; Hacker, 2000). Zusammen mit der gesteigerten Expression von Zelltod-assoziierten Genen (Pensold et al., 2016), bekräftigen die erhobenen Daten die protektive Funktion von DNMT1 im Hinblick auf das Überleben von unreifen Interneuronen während ihrer tangentialen Migration.

Interessanterweise konnten im Kortex von *Dnmt1* Knockout-Tieren an P0, im Gegensatz zu den analysierten Zellen im basalen Telenzephalon, keine Unterschiede in der Mortalitätsrate der POA-abstammenden Interneurone detektiert



werden (Abb. 10). Fan und Kollegen (2001) konnten in ihrem Mausmodell nach Deletion von *Dnmt1* in neuronalen Vorläuferzellen ein erhöhtes Zellsterben von *Dnmt1*-defizienten exzitatorischen Neuronen bis einschließlich der dritten postnatalen Woche beobachten. Während der postnatalen Reifung sind die Justierung der adäquaten Neuronenanzahl und die Etablierung neuronaler Netzwerke entscheidend für die Funktionalität von kortikalen Schaltkreisen (Miller, 1995; Bartolini et al., 2013). Da Interneurone und auch Projektionsneurone während der Gehirnentwicklung in größerer Anzahl entstehen, als final benötigt werden (Miller, 1995; Bartolini et al., 2013), spielt die postnatale Regulation des Zelltods eine fundamentale Rolle. Inwieweit DNMT1 auch in dieser Entwicklungsphase das Überleben der POA-abstammenden Interneurone reguliert, würde weitere Untersuchung benötigen. Jedoch zeigte die prozentuale Reduktion kortikaler *Hmx3*-abstammender Zellen zwischen *Dnmt1* Wildtyp und Knockout keinen progressiven Verlauf mit fortschreitender Entwicklung. Sie entsprach auch an P0 und im adulten Stadium ungefähr dem Verhältnis von E16 Tieren (Abb. 7, 10; (Pensold et al., 2016)). Diese Ergebnisse bekräftigen eher eine entscheidende Entwicklungs-assoziierte Funktion von DNMT1, wie sie auch in einer Vielzahl von Studien bereits postuliert wird (Fan et al., 2001; Golshani et al., 2005; Hutnick et al., 2009; Rhee et al., 2012; Noguchi et al., 2015).

### **6.3. DNMT1 reguliert die Expression Zelltod-assoziiierter Proteinkinasen**

Das Überleben neuronaler Zellen wird durch eine Reihe verschiedener Signalmoleküle und intrazellulärer Signalkaskaden gelenkt (Kristiansen und Ham, 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte *Pak6* als ein Zelltod-assoziiertes Gen herausgestellt werden, dass in unreifen POA-abstammenden Interneuronen der Repression von DNMT1 unterliegt (Abb. 11). Die hier vorgestellten Daten konnten dabei zeigen, dass eine abnormal erhöhte Expression der p21-aktivierten Proteinkinase (PAK) 6 mit einer gesteigerten Mortalität jener Zellen einhergeht (Abb. 12). Studien an verschiedenen Krebszelllinien konnten bereits die Zelltod-vermittelnde Funktion von PAK6 darlegen (Zhang et al., 2010; Liu et al., 2015).

Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der hochkonservierten Familie an Serin/Threonin-Proteinkinasen wird PAK6 insbesondere durch Bindung des

Androgen- (AR) und Estrogenrezeptor alpha (ER $\alpha$ ) stimuliert (Yang et al., 2001; Lee et al., 2002; Vidal et al., 2002; Liu et al., 2013). Typischerweise wird die Aktivität von PAK's über die N-terminale Bindedomäne für CDC42/RAC moduliert (Kumar et al., 2017).

Eine verstärkte Translokation von PAK6 aus dem Zytoplasma in den Zellkern erfolgt zum Beispiel nach Bindung von AR oder ER $\alpha$  und Hormon-abhängig (Lee et al., 2002). Im Nukleus hat PAK6 unter anderem auch Einfluss auf die Genaktivität und zeigt inhibierende Funktionen bei der Expression von AR- und ER $\alpha$ -abhängigen Genen. Lee und Kollegen (2002) spekulieren darüber hinaus aber auch, dass neben der Beteiligung an der Expressionskontrolle insbesondere seine Kinase-Aktivität zur schnellen und nicht transkriptionellen Aktivierung von MAP-Kinasen und weiteren Signalwegen führen könnte.

MAP-Kinasen haben in Neuronen wichtige Funktionen in der Regulation von Differenzierung und Zelltod (Tobiume et al., 2001; Nishitoh et al., 2002; Frebel und Wiese, 2006) und für einige (*Map3k5*, *Map3k19*, *Mapk4*, *Mapkapk3*) konnte eine signifikant erhöhte Expressionen in *Dnmt1*-defizienten, embryonalen Zellen der *Hmx3*-Population detektiert werden (Tab. 10 Anhang). Inwieweit PAK6 in die Aktivierung dieser MAP-Kinasen involviert ist, wurde bislang noch nicht untersucht. Jedoch konnten verschiedene Studien bereits zeigen, dass Typ I PAK's (PAK1-3) über Phosphorylierung von MAPK3/4 (ERK3/4) den atypischen MAPK-Signalweg aktivieren können (Slack-Davis et al., 2003; Deleris et al., 2011). Über die Beteiligungen weiterer PAK-Proteinkinasen in der MAPK-Signalkette abhängig vom zellulären Kontext wird spekuliert (Deleris et al., 2011). Aufgrund der MAP3K übergeordneten Regulation werden PAKs auch als MAP3K-Kinasen (MAP4K) betitelt (Dan et al., 2001)

Weiterführende Studien könnten Aufschluss darüber geben, ob die erhöhte Expression der MAP-Kinasen im *Dnmt1* Knockout direkt von PAK6 induziert wird. Darüber hinaus könnten Analysen zum Phosphorylierungslevel klären, ob auch ein erhöhter Aktivitätsindex jener MAPK vorliegt und inwieweit PAK6 hierbei eine funktionelle Rolle spielt. Zusammenfassen lässt sich, dass DNMT1 durch die Regulation einzelner Gene, zum Beispiel von Proteinkinasen wie PAK6 ganze Netzwerke beeinflussen kann und somit eine entscheidende Rolle bei der Sicherung des Überlebens von unreifen Interneuronen einnimmt.

#### **6.4. Der Transkriptionsfaktor LHX1 begrenzt das Überleben von POA-abstammenden Zellen**

Neben der Regulation von Proteinkinasen, deuten die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse darauf hin, dass auch wichtige Transkriptionsfaktoren der Kontrolle von DNMT1 unterliegen (Tab. 10 Anhang). Über die Regulation von Transkriptionsfaktoren ergeben sich noch viel umfassendere Möglichkeiten der transkriptionellen Kontrolle verschiedenster Gene und ganzer genetischer Programme (Kessar et al., 2014).

Es zeigte sich eine im POA überlappende Expression von postmitotischen Zellen der *Hmx3*-Population und *Lhx1*, welches für einen LIM-HD-Transkriptionsfaktor kodiert (Abb. 15, (Bozzi et al., 1996; Hobert und Westphal, 2000; Shirasaki und Pfaff, 2002)). Die Expression von *Lhx1* scheint dabei, ähnlich wie *Pak6*, durch DNMT1 reguliert zu werden (Abb. 16). LHX1 scheint bei der Entwicklung von POA-abstammenden Interneuronen eine Rolle zu spielen, wie Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit am konditionalen Mausmodell zeigten (*Hmx3-Cre/tdTomato/Lhx1 loxP2*).

Die postmitotische Deletion von *Lhx1* in *Hmx3*-exprimierenden POA-Zellen führte zu einem Anstieg ihrer Anzahl im adulten murinen Kortex, sowie dem Septum und auch ihrer residualen Fraktion im präoptischen Areal (Abb. 19, 20). Dass es sich hierbei um entwicklungsbedingte Effekte handelt, lassen die bereits an embryonalen Stadien detektierten, erhöhten Zellzahlen im Pallium und Subpallium vermuten (Abb. 17). Durchgeführte *in vitro* Untersuchungen unterstützten dabei die Hypothese, dass LHX1 Zelltod-regulierende Funktionen in POA-Zellen hat (Abb. 18). In diesem Zusammenhang konnten bereits verschiedene Studien in diversen Zelltypen zeigen, dass Veränderungen in der Expression von *Lhx1* das Zellüberleben beeinflussen (Zhao et al., 2007; Dormoy et al., 2011; Kawaue et al., 2012; Bedont et al., 2014; Huang et al., 2014).

Diesbezüglich konnten in der vorliegenden Arbeit mehrere anti-apoptotische Gene in N2a-Zellen mit verringertem *Lhx1* Expressionslevel erhöht vorgefunden werden (Abb. 18). Zu diesen zählen auch zwei Mitglieder der BCL-2 Familie, *Bcl2* und *Bcl6* (Merry und Korsmeyer, 1997). Mitglieder dieser Proteinfamilie werden durch die typische BCL-2 Homologieregion (BH) charakterisiert und steuern das Überleben neuronaler Zellen entlang ihrer Entwicklung, aber auch an adulten

Stadien (Merry und Korsmeyer, 1997). *Bcl2* kodiert für den klassischen Vertreter der Genfamilie und wird während der Entwicklung weit verbreitet im Nervensystem exprimiert (Abe-Dohmae et al., 1993; Merry et al., 1994). In einer Vielzahl von Studien konnten die durch BCL2 vermittelten protektiven Effekte klar herausgestellt werden, welche das Überleben von Neuronen signifikant erhöhten (Abe-Dohmae et al., 1993; Allsopp et al., 1993; Mah et al., 1993; Martinou et al., 1994; Farlie et al., 1995; Michaelidis et al., 1996). Ähnlich wie BCL2 konnte auch für BCL6 eine aktive Rolle bei der Regulation des Überlebens, zum Beispiel von olfaktorisch-sensorischen Neuronen, dargestellt werden (Otaki et al., 2010).

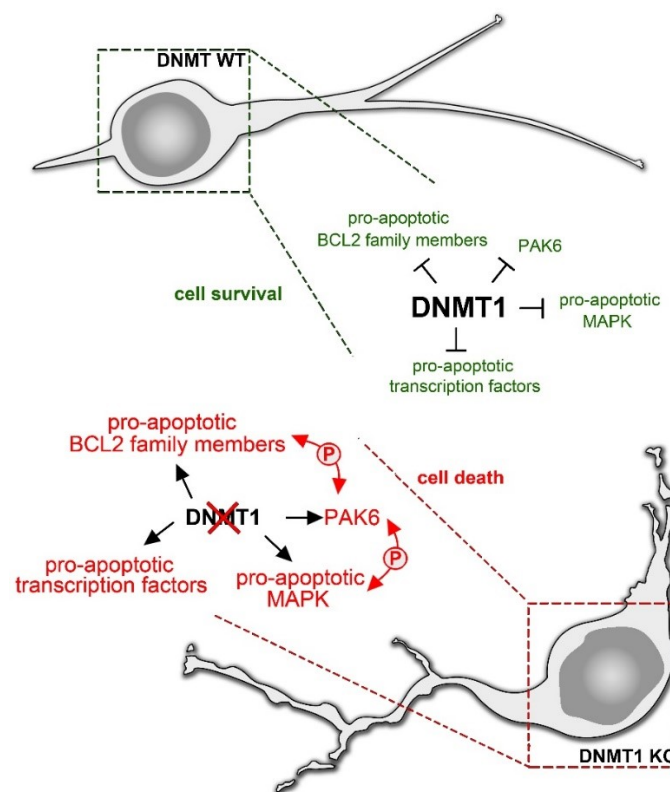
Auch wenn die meisten Studien zu LIM-HD-Proteinen die veränderten Mortalitätsraten auf Defekte in der Zelldifferenzierung zurückführen (Zhao et al., 2007; Bedont et al., 2014; Huang et al., 2014), konnte für einige Mitglieder der LIM-HD-Familie bereits eine aktive Regulation von Apoptose-relevanten Genen beschrieben werden (Liu et al., 2013; Sato und Shibuya, 2013). Die hier erhobenen Ergebnisse bekräftigen die Annahme, dass auch LHX1 neben seinen bekannten Funktionen in der Zelldifferenzierung, die Expression von Apoptose-relevanten Genen regulieren kann (Barnes et al., 1994; Tsang et al., 2001; Zhao et al., 2007; Kawaue et al., 2012; Inoue et al., 2013; Bedont et al., 2014).

Eine gesteigerte Expression von anti-apoptotischen Genen in Folge der *Lhx1*-Deletion könnte die erhöhten Zellzahlen in den analysierten Hirnbereichen erklären. Inwieweit diese Gene in unreifen POA-abstammenden Interneuronen der Repression von LHX1 unterliegen, ist bisher noch unbekannt. Lui und Kollegen (2013) konnten für den nahen Verwandten LHX6, welcher in MGE-abstammenden Interneuronen exprimiert wird, auch eine Verbindung zu BCL2 aufzeigen. Dabei führte eine gesteigerte LHX6 Expression in der humanen Krebszelllinie H358 auch zu einer Reduktion der *Bcl2* Expression, möglicherweise jedoch indirekt über ein erhöhtes p53 Level. Der pro-apoptotische Transkriptionsfaktor p53 aktiviert üblicherweise die Expression weiterer Gene, die sowohl Wachstumsstopp als auch den Zelltod fördern (Morrison und Kinoshita, 2000). Möglicherweise kommt dieser Regulationsmechanismus auch für LHX1 in Frage. Dies bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend zeigt sich, dass LHX1 anti-apoptotische Gene zu reprimieren scheint, was in Folge eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Initiierung von Zelltodprogrammen darstellt (Portt et al., 2011). Der Zelltod ist während der

Entwicklung von Interneuronen, zum Beispiel im Fall von Defekten bei der Differenzierung oder Migration, wichtig für die Eliminierung der Zellen. So lässt sich spekulieren, inwieweit LHX1 in POA-abstammenden Interneuronen als Übermittler von externen oder internen Signalen fungiert und durch Repression von anti-apoptotischen Genen den Zelltod vermitteln könnte.

Dem übergeordnet scheint DNMT1 bei der Sicherung des Überlebens von unreifen Interneuronen durch Regulation verschiedener Faktoren eine essentielle Rolle zu spielen. Abbildung 24 umfasst die in dieser Arbeit hervorgehobenen Zelltodregulatoren, zu den PAK6, verschiedene MAPK, Transkriptionsfaktoren wie LHX1 und Mitglieder der BCL2-Familie gehören. Neben der Regulation von Zellüberleben/-tod haben viele der durch DNMT1 regulierten Faktoren, sowie deren untergeordneten Zielgene/-proteine auch weitere essentielle Funktionen bei der neuronalen Entwicklung (Fukunaga und Miyamoto, 1998; Shirasaki und Pfaff, 2002; Kumar et al., 2017).



**Abbildung 24: DNMT1 fördert das Überleben von unreifen migrierenden inhibitorischen Interneuronen des zerebralen Kortex.** DNMT1 scheint pro-apoptotische Gene der PAK-Familie wie PAK6 sowie MAP-Kinasen und Mitglieder der BCL2-Familie zu inhibieren um das Überleben und den typischen migratorischen Phänotyp von unreifen Interneuronen sicherzustellen (DNMT1 WT). Darüber hinaus scheint DNMT1 auch Transkriptionsfaktoren wie LHX1 mit potentiellen pro-apoptotischen Funktionen zu reprimieren. Die Deletion von *Dnmt1* vermindert die Repression dieser pro-apoptotischen Gene, was zu einer erhöhten Expression in migrierenden Interneuronen führt (DNMT1 KO). Die anschließende Aktivierung untereinander und nachgeschalteter Signalwege durch Phosphorylierung oder transkriptionelle Regulation könnte ursächlich für morphologische Defekte sein und zu einer erhöhten Zellmortalität führen. Aus Symmank und Zimmer (2017)

### **6.5. DNMT1 sichert die adäquate Migration unreifer Interneurone in den zerebralen Kortex**

Wie zuvor erwähnt haben eine Vielzahl der von DNMT1 regulierten Zelltod-assoziierten Gene auch Funktionen in anderen entwicklungsrelevanten Prozessen (Fukunaga und Miyamoto, 1998; Shirasaki und Pfaff, 2002; Kumar et al., 2017). Zu diesen Prozessen zählt in unreifen Interneuronen vor allem die Migration aus dem basalen Telenzephalon in entsprechende Zielareale (Marin und Rubenstein, 2001; Guo und Anton, 2014). In diesem Zusammenhang deuten die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten umfassende phänotypische Analysen von embryonalen wildtypischen und *Dnmt1* Knockout-Zellen (Abb. 7), sowie detaillierte morphologische Analysen und Zeitrafferaufnahmen von organotypischen Hirnschnittkulturen (Abb. 8, 9; Film 1-4) auf Defekte in der Migration hin. Diese basieren dabei auf einer veränderten Morphologie und reduzierten Migrationskapazität von *Dnmt1*-defizienten POA-abstammenden Interneuronen. Dass die DNA Methyltransferase durchaus die Wanderung von neuronalen Zellen während der Gehirnentwicklung beeinflussen kann, zeigten Untersuchungen am embryonalen Gyrus dentatus (Noguchi et al., 2015). Hierbei führte eine Deletion in neuronalen Stammzellen zu einer fehlerhaften Ausbildung radialer Fortsätze, gefolgt von einer reduzierten Migration in die subgranuläre Zone.

Für die Migration von Interneuronen ist eine stetige Reorganisation des Zytoskeletts und der Plasmamembran für die Ausbildung typischer morphologischer Charakteristika entscheidend (Metin et al., 2006; Chedotal und Rijli, 2009). In diesem Zusammenhang konnte eine veränderte Expression von Genen in *Dnmt1*-defizienten Zellen erfasst werden, welche in Verbindung mit jenen Reorganisationsprozessen stehen (Chedotal und Rijli, 2009). In Krankheitsrelevanten Studien konnten passenderweise insbesondere für Gene anormale Methylierungsmuster detektiert werden, die für strukturelle oder regulatorische Proteine des Zytoskeletts kodieren (Hughes et al., 2014; Calmon et al., 2015). Somit bestärken die hier dargestellten Ergebnisse die in der Literatur postulierte Funktion von DNMT1. Diese beinhaltet die Kontrolle von Faktoren, die mit der Regulation des Zytoskeletts assoziiert sind, dessen dynamischer Veränderung Grundlage für eine koordinierte Zellmigration darstellt (Metin et al., 2006; Chedotal und Rijli, 2009).

Verschiedenen Mitgliedern der PAK-Familie, so auch PAK6, konnten in diesem Zusammenhang bereits eine Rolle bei der Regulation des dynamischen Auf- und Abbau von Zytoskelett-Bestandteilen nachgewiesen werden (Szczepanowska, 2009; Zhao und Manser, 2012; Kumar et al., 2017). Die durch Manipulationen des *Pak6* Expressionslevel hervorgerufenen morphologischen Veränderungen in POA-Einzelzellen bestätigen die Relevanz der Kinase für die Regulation der Zellmorphologie (Abb. 11).

*Dnmt1*-defiziente Zellen mit nachweislich erhöhter *Pak6*-Expression zeigten interessanterweise neben einer reduzierten Nettomigration und geringeren Migrationsgeschwindigkeiten auch eine verringerte Translokation des Zellsomas in Migrationsrichtung. Die Translokation von Zellorganellen und des Nukleus in Migrationsrichtung (Nukleokinese) ist dabei, zusammen mit der vorhergehenden Stabilisierung des Führungsfortsatzes, entscheidend für die aktive Fortbewegung (Morris et al., 1998; Walsh und Goffinet, 2000; Ridley et al., 2003; Bellion et al., 2005; Britto et al., 2009; Yanagida et al., 2012; Tielens et al., 2016). Jene Prozesse werden dabei durch Aktin-Myosin-Kontraktionen und Veränderungen im Mikrotubuli-Netzwerk reguliert (Tielens et al., 2016). Defekte entsprechender Proteine führten dabei bereits in vielen Studien zu morphologischen Auffälligkeiten, einer eingeschränkten Migration und dem Zelltod (Bellion et al., 2005; Schaar und McConnell, 2005; Martini und Valdeolmillos, 2010; Steinecke et al., 2014).

Für PAK6 konnte jüngst eine Rolle bei der Aktivierung von Myosin II über den RhoC-ROCK-Signalweg in *HeLa*-Zellen dargestellt werden (Durkin et al., 2017). PAK6 wirkt hierbei inhibierend auf die Aktivierung von ROCK durch Blockierung von RhoC und verhinderte dadurch die Myosin-vermittelte Kontraktion von Aktin-Filamenten (Durkin et al., 2017). Diese Kontraktion ist jedoch für die Fortbewegung unerlässlich (Brown und Bridgman, 2004). Somit könnte die verringerte Migrationskapazität und reduzierte Translokationsrate von *Dnmt1*-defizienten POA-Zellen durchaus mit einer von PAK6 induzierten Inhibierung von Mitglieder der Rho-Proteinfamilie zusammenhängen, die unter wildtypischen Bedingungen durch DNMT1-vermittelte Repression von *Pak6* verhindert wird.

## **6.6. Eine verfrühte Komplexitätszunahme wird durch DNMT1 in migrierenden Interneuronen unterbunden**

Nach Abschluss der migratorischen Phase und Ankunft im zerebralen Kortex beginnen Interneurone mit der Ausbildung von axonalen und dendritischen Ausläufern (Andersen und Bi, 2000; Huang et al., 2007), sowie der Etablierung von synaptischen Verbindungen (Huang, 2009; Chattopadhyaya, 2011). Hierbei ist die Zunahme der Zellkomplexität ein sichtbares Merkmal für die Reifung von inhibitorischen Neuronen (Kelsom und Lu, 2013; Begum und Sng, 2017).

Die detektierten morphologischen Veränderungen von *Dnmt1*-defizienten Zellen aus dem POA deuten insbesondere aufgrund ihrer Komplexitätszunahme auf eine frühzeitige Ausdifferenzierung im basalen Telenzephalon hin (Begum und Sng, 2017). Civiero und Kollegen (2015) konnten hierzu zeigen, dass PAK6 während der Entwicklung von kortikalen exzitatorischen Neuronen eine gesteigerte Verzweigung ihrer Fortsätze anregt und dabei zur Erhöhung der zellulären Komplexität beiträgt. Somit könnte die gesteigerte *Pak6*-Expression in *Dnmt1* Knockout-Zellen ebenfalls die detektierte Komplexitätszunahme jener unreifen Interneuronen aus dem POA bedingen, wie auch die Überexpression in kultivierten POA-Zellen vermuten ließ (Abb. 11).

Darüber hinaus spielt für die Aktivierung von PAK6 die Serin/Threoninkinase LRRK2 durch Stimulation der Autophosphorylierung eine entscheidende Rolle (Civiero et al., 2015). LRRK2 ist auch in Interneuronen exprimiert (Tab. 10 Anhang; (Higashi et al., 2007)) und *Dnmt1*-defiziente POA-abstammende Zellen zeigen interessanterweise ein erhöhtes *Lrrk2*-Expressionsniveau (Tab. 10 Anhang). Eine Überaktivierung von PAK6 durch erhöhte LRRK2 Expression führte in Projektionsneuronen ebenfalls zu einer gesteigerten Zellkomplexität (Civiero et al., 2015). Somit könnte neben der allgemein erhöhten *Pak6*-Expression auch eine gesteigerte Aktivierung für die verfrühte Ausbildung der untypisch komplexen, morphologischen Charakteristika zuträglich sein. In embryonalen wildtypischen Zellen wird diese durch DNMT1-vermittelte Genrepression unterbunden.

Nach Ankunft im Kortex scheinen POA-abstammende Zellen der *Hmx3*-Population vermehrt *Pak6* zu exprimieren, worauf quantitative RNA-Messungen an P0 hindeuteten (Abb. 11). Dies legt eine Funktion von PAK6 in der postnatalen Differenzierung und zellulären Komplexität von reifenden, im Kortex



angekommenen Interneurone nahe. Dies konnte auch schon für PAK3 in MGE-abstammenden kortikalen Interneuronen gezeigt werden (Cobos et al., 2007). Zusammenfassend deuten die Daten somit stark darauf hin, dass DNMT1 durch die Repression von Genen wie *Pak6* zur Ausprägung der charakteristischen Morphologie migrierender Interneurone beiträgt, die Migrationskapazität jener Zellen aufrechterhält und eine frühzeitige Reifung verhindert (Abb. 24). Somit ermöglicht DNMT1 die Migration POA-abstammender kortikaler Interneurone von ihrem Ursprungsort im basalen Telenzephalon zu ihren Zielarealen im Neokortex.

### **6.7. Die Lenkung von tangential migrierenden POA-Interneuronen wird durch LHX1 beeinflusst**

Für Interneurone aus verschiedenen proliferativen Zonen sind unterschiedlich präferierte tangentielle Migrationsrouten in der Literatur beschrieben, welche unter anderem auf einer differentiellen Expression von Lenkungsfaktoren basieren (Marin und Rubenstein, 2003; Metin et al., 2006; Hernandez-Miranda et al., 2010; Guo und Anton, 2014). Dabei konnten verschiedene Studien verdeutlichen, dass POA-abstammende Interneurone den superfiziellen Weg in den Kortex bevorzugen (Gelman et al., 2009; Zimmer et al., 2011; Pensold et al., 2016), wohingegen MGE-abstammende Interneurone bevorzugt entlang des tiefen Migrationsweges wandern (Sussel et al., 1999; Wichterle et al., 2001; Ang et al., 2003; Rudolph et al., 2010; Zimmer et al., 2011).

Nicht nur Defekte in der Migrationsdynamik, wie zuvor diskutiert, sondern auch in der Expression von Lenkungsfaktoren können zu einer gestörten Migration und zu Fehlpositionierungen führen (Stumm et al., 2003; Alifragis et al., 2004; Pozas und Ibanez, 2005; Liodis et al., 2007; Canty et al., 2009; Wang et al., 2011; Zimmer et al., 2011; Zarbalis et al., 2012; van den Berghe et al., 2013).

Auch wenn DNMT1 die Expression von *Lhx1* *in vitro* reprimiert, scheint das LIM-HD-Protein potentiell für *Hmx3*-exprimierende Zellen des POA relevant zu sein. Da *Dnmt1* nicht in allen postmitotischen Neuronen des POA exprimiert ist (Pensold et al., 2016) und somit *Lhx1* wahrscheinlich nicht in allen POA-abstammenden Interneuronen seiner Repression unterliegt, ist dies durchaus möglich. Ähnlich wie *Lhx6*-defiziente MGE-abstammende Interneurone (Alifragis et al., 2004; Liodis et

al., 2007) zeigten tangential wandernde Zellen aus dem POA nach Deletion von *Lhx1* embryonal ein verändertes Migrationsverhalten, sowie eine fehlerhafte Zelllokalisierung im adulten Kortex (Abb. 21; Abb. 22). Dies bestätigt die in der Literatur beschriebene Rolle von LIM-HD-Faktoren bei der Regulation der Zellmigration (Palmesino et al., 2010; Tanaka et al., 2010). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Untersuchungen stellten eine LHX1-abhängige Aktivierung der *Unc5b* Expression heraus (Abb. 23), welches für einen membrangebundenen Rezeptor kodiert und klassischerweise repulsive Effekte nach der Bindung an seinen Rezeptor Netrin-1 (NTN1) vermittelt (Leonardo et al., 1997; Arakawa, 2004; Eichmann et al., 2005; Larrieu-Lahargue et al., 2012). Van den Berghe und Kollegen (2013) konnten in diesem Zusammenhang eine abnormal erhöhte UNC5B Expression bereits als Ursache für migratorische Defekte in MGE-abstammenden *Sip1*-defizienten Interneuronen bestimmen. Diese verblieben in erhöhter Anzahl im basalen Telenzephalon. UNC5B könnte somit für die Migration von POA-abstammenden Interneuronen ebenfalls relevant sein und scheint durch LHX1 regulierbar.

In Bezug zur Navigierung jener Zellen in Richtung der superfiziellen Route zeigte sich im basalen Telenzephalon in der Intermediärzone zwischen POA und MGE ein möglicherweise relevantes Cluster von *Ntn1*-exprimierenden Zellen (Abb. 23; (Stanco et al., 2009)). Wildtypische UNC5B-exprimierende POA-Interneurone könnten durch diese NTN1-sezernierenden Zellen vom Eintritt in den tiefen Migrationsweg abgelenkt und auf den superfiziellen Pfad dirigiert werden. Demzufolge könnte die in *Lhx1* Knockout-Tieren beobachtete verstärkte Wanderung entlang des tiefen Migrationsweges auf einer reduzierten Detektion von repulsiven NTN1 Signalen durch die verringerte Aktivierung der *Unc5b*-Expression beruhen. Auch wenn einzelne Studien nach direkter Manipulation der *Ntn1* Expression keine Defekte in der Migration von MGE-abstammenden Interneuronen in Bezug auf ihre finale Anzahl im adulten Kortex darstellen konnten (Marin et al., 2003; van den Berghe et al., 2013), bleibt eine potentielle Rolle in Interneuronen aus dem POA offen, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

Für ihre Navigierung entlang der bevorzugten Migrationswege sind darüber hinaus weitere relevante Lenkungsfaktoren bereits beschrieben, darunter auch Mitglieder der Ephrin/Eph-Ligand/Rezeptor-Familie (Zimmer et al., 2008; Rudolph et al., 2010; Zimmer et al., 2011; Rudolph et al., 2014; Steinecke et al., 2014). Weiterhin ist

bekannt, dass LHX1 die Expression einiger Ephrine und Eph-Rezeptoren reguliert (Kania und Jessell, 2003). Zu diesen zählt auch EPHA4 (Kania und Jessell, 2003), welches in POA-abstammenden Interneuronen üblicherweise reprimiert vorliegt (Zimmer et al., 2011). Übereinstimmend mit der verstärkten Präferenz von POA-abstammenden Zellen für den superfiziellen Migrationsweg konnte eine LHX1-abhängige Repression von EPHA4 in ersten Versuchen im Zellkulturmodell nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten). Die bereits beschriebene von EphA4/EphrinB3-vermittelte, bidirektionale Repulsion und die damit verbundenen Ablenkung von POA-abstammenden Interneuronen auf den superfiziellen Migrationsweg (Zimmer et al., 2011) könnte somit im *Lhx1* Knockout auch aufgrund abnormaler EPHA4 Expression gestört sein. Weitere Untersuchung sollen zur Aufklärung dieser Vermutung durchgeführt werden.

Da eine veränderte tangential Migration oft auch mit einer nachfolgenden, veränderten Positionierung im adulten Kortex assoziiert ist (Marin und Rubenstein, 2003; Hernandez-Miranda et al., 2010; Guo und Anton, 2014), könnten die zuvor dargestellten Zusammenhänge die verminderte Lokalisierung von *Lhx1*-defizienten Zellen in der superfiziellen Schicht I des zerebralen Kortex erklären (Abb. 21). Darüber hinaus ist es nicht unwahrscheinlich, dass LHX1 auch weitere Faktoren reguliert, welche Positionsinformationen für POA-abstammende Interneurone bieten.

Die gewonnenen Erkenntnisse unterstützen die Vielzahl an Studien, die verdeutlichen, dass die Expressionkontrolle des Rezeptorrepertoires eine entscheidende Rolle bei der Lenkung der tangentialen Migration, aber auch während der Positionierung im Kortex spielt (Marin und Rubenstein, 2003; Metin et al., 2006; Hernandez-Miranda et al., 2010; Guo und Anton, 2014). Darüber hinaus festigen sie die bereits postulierte Funktion von LHX1 in der Lenkung von neuronalen Zellen (Palmesino et al., 2010). Insgesamt betonen sie aber insbesondere die relevante Rolle von DNMT1 in der übergeordneten Kontrolle einer Vielzahl von Faktoren, wie LHX1 und PAK6. Diese Kontrolle scheint nicht nur essentiell für das Überleben von unreifen Interneuronen, sondern auch für die adäquate Migration zu ihrer Zielposition im Kortex.

### **6.8. Die Vernetzung verschiedener epigenetischer Mechanismen reguliert die differente Genexpression**

Neuronale Entwicklungsprozesse unterliegen einer vielschichtigen epigenetischen Regulation (Geiman und Robertson, 2002; Fuks, 2005; Vaissiere et al., 2008; Cedar und Bergman, 2009), wie auch korrelative Methylom- und Transkriptomanalysen von embryonalen POA-abstammenden Zellen bestätigten (Pensold et al., 2016). Die Zelltod- und Migrationsassoziierten Gene *Pak6* und *Lhx1* zeigten sich zwar abhängig von DNMT1, jedoch unabhängig von seiner DNA-Methylierungsfunktion (Abb. 14, 16; (Pensold et al., 2016)). Weitere Untersuchungen hinsichtlich der Verknüpfung von DNMT mit der Ausprägung der repressiven Histonmodifizierung H3K27me3 bekräftigen die in einer Vielzahl von Studien beschriebene Interaktion von DNMT1 mit Histon-modifizierenden Enzymen (Cedar und Bergman, 2009; Du et al., 2015), hier speziell mit der Histonmethyltransferase EZH2 (Vire et al., 2006; Ning et al., 2015; Purkait et al., 2016). Als Kernenzym des Polycomb-Repressorkomplex 2 (PCR2) vermittelt EZH2 jene repressiven Trimethylierungen an H3K27 (Margueron und Reinberg, 2011). Die Intensität der H3K27-Trimethylierung zeigte sich in der vorliegenden Arbeit abhängig von der *Dnmt1*-Expression, so wie auch das Transkriptlevel von *Ezh2* (Abb. 14). In diesem Zusammenhang wurde bereits die regulatorische Rolle von *miR214* als Ursache für den Abbau von *Ezh2* Transkripten eruiert (So et al., 2011). Inwieweit diese auch hier nach *Dnmt1*-Deletion den Abbau von *Ezh2* vermittelt, müssen weitere Untersuchungen klären.

Kürzlich durchgeführte Proteinexpressionsstudien an *Dnmt1* siRNA-behandelten N2a-Zellen bestätigen nach 24 h Kultivierungsdauer eine Reduktion der H3K27-Trimethylierung (unveröffentlichte Daten). Jedoch kein verringertes Expressionslevel von EZH2 nach dieser Kultivierungsdauer detektiert werden (unveröffentlichte Daten). Die dargestellten Ergebnisse bestätigen somit nur teilweise Studien in nicht-neuronalen Zellen, in denen Manipulation der Funktionalität oder Expression von DNMT1 zu Veränderungen des EZH2 Expressionsniveaus und der Häufigkeit von H3K27me3 führten (So et al., 2011; Purkait et al., 2016).

Auch in POA-Zellen von *Dnmt1* Knockout-Mäusen sind keine signifikanten Unterschiede in der Expression von *Ezh2* zu finden, wie vergleichende Transkriptomanalysen von angereicherten wildtypischen und *Dnmt1*-defizienten POA-Zellen zeigten (Tab. 10 Anhang). Möglicherweise führt somit eher die ausbleibende Interaktion von DNMT1 mit EZH2 aufgrund des geringeren *Dnmt1*-Expressions-niveaus zu einer verminderten Aktivität von EZH2. Co-Immunpräzipitation von DNMT1 und EZH2 in N2a- und POA-Zellen unterstützen diese Möglichkeit (unveröffentlichte Daten). Die damit verbundene verringerte H3K27-Trimethylierung an regulatorischen Gensequenzen von *Pak6* und *Lhx1* könnte somit eine schwächere Repression der Genaktivität zur Folge haben und somit zu einer erhöhten Expression beider Transkripte führen.

Eine DNMT1-abhängige Regulation über Veränderungen der Ausprägung von H3K27me3 konnte zumindest für *Pak6* in hepatozellulären Karzinomazellen bereits dargestellt werden (Liu et al., 2015). Für *Lhx1* hingegen gab es bisher jedoch noch keine Hinweise auf eine mögliche Regulation durch repressive Histonmodifikationen in neuronalen Zellen.

DNMT1 reguliert somit zusammenfassend nicht nur durch DNA-Methylierung Zielgene, sondern die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auch in neuronalen Zellen auf eine intensive Vernetzung mit repressiven Histonmethylierungen hin. Diese Interaktion epigenetischer Mechanismen ist dabei scheinbar essentiell für die Repression einer Vielzahl von Migrations- und Zelltod-assoziierten Genen, zu denen auch *Pak6* und *Lhx1* gehören. Die vorliegenden Daten konnten somit auch in neuronalen Zellen die Wichtigkeit der Interaktion von DNMT1 und EZH2 in der Repression von Genen verdeutlichen, wie auch bereits für DNMT1 und spezifische Histondeacetylasen bekannt ist (Fuks et al., 2000; Arzenani et al., 2011).

## **6.9. Schlussfolgerungen und Ausblick**

Die durch Methyltransferasen (DNMT) vermittelte DNA Methylierung ist ein potenter Mechanismus zur Etablierung spezifischer Genexpressionsmuster und DNMT1 konnte in der vorliegenden Arbeit als wichtiger Regulator der Entwicklung von POA-abstammenden Interneuronen dargestellt werden. Dabei scheint insbesondere die Vernetzung verschiedener epigenetischer Mechanismen für die Regulation von Migrations- und Zelltod-assoziierten Genen wie *Pak6* und *Lhx1* von Bedeutung zu sein.

Neben Veränderungen von repressiven Histonmethylierungen, könnten auch erhöhte Level von aktivierenden Methylierungen, zum Beispiel an H3K4, in der Regulation von Genen in POA-abstammenden Interneuronen von Relevanz sein. Hierauf deutet die differente Expression von entsprechenden Faktoren zwischen wildtypischen und *Dnmt1*-defizienten Zellen hin (Tab. 10 Anhang). So konnte zum Beispiel eine erhöhte Expression von *Kmt2d* in *Dnmt1* Knockout-Zellen detektiert werden, welche für die Histonmethyltransferase MLL2 kodiert. Diese ist ein Kernenzym des MLL-Komplex und reguliert bevorzugt H3K4-Methylierungen (Wang et al., 2009; Jiang et al., 2013). DNMT könnte die Expression von MLL2 und somit die Ausbildung aktivierender H3K4-Methylierungen reprimieren, welche in Kombination mit repressiven H3K27-Trimethylierungen die Aktivität entsprechender Gene einschränken könnte. Eine jene Vernetzung in der Regulation von repressiven H3K27 und aktivierenden H3K4-Methylierungen ist in der Literatur bereits umfassend beschrieben (Barski et al., 2007; Mikkelsen et al., 2007; Eissenberg und Shilatifard, 2010). So gilt die PCR2-vermittelte Genrepression als relativ leicht umkehrbar, was einen schnellen und flexiblen Wechsel zwischen transkriptionellen Zuständen ermöglichen soll (Bernstein et al., 2006; Rugg-Gunn et al., 2010; Voigt et al., 2013; Harikumar und Meshorer, 2015).

Darüber hinaus führt die Deletion von *Dnmt1* in embryonalen *Hmx3*-exprimierenden Zellen zu einer signifikant verminderten Expression von *Cul4b* (Tab. 10 Anhang). Neben seiner Rolle im Abbau von Proteinen des MLL-Komplex (Nakagawa und Xiong, 2011), konnte bereits gezeigt werden, dass CUL4B die Stabilität des SIN3a/HDAC Komplex verstärkt (Ji et al., 2014). Der SIN3a/HDAC Komplex

vermittelt Histondeacetylierungen und somit eine erhöhte Chromatinkondensation (Eberharter und Becker, 2002). Eine reduzierte Expression von *Cul4b* könnte somit eine geringeren Abbau des MLL-Komplex bedeuten und die Histonacetylierung ermöglichen. So könnten auch weitere Histonmodifikationen Einfluss auf die Expression von Genen im *Dnmt1* Knockout haben.

Expressionsanalysen könnten die differenzielle Ausbildung von Histon-modifizierenden Proteinen beleuchten. Darüber hinaus könnten weitere Studien hinsichtlich der Assoziation von H3K4me3, sowie von acetylierten H3 und H4 an entsprechenden regulatorischen Gensequenzen die Regulationsmechanismen genauer charakterisieren

## 7. Literaturverzeichnis

- Abe-Dohmae, S., N. Harada, K. Yamada and R. Tanaka (1993). "Bcl-2 gene is highly expressed during neurogenesis in the central nervous system." *Biochemical and biophysical research communications* **191**(3): 915-921.
- Agoston, A. T., P. Argani, S. Yegnasubramanian, A. M. De Marzo, M. A. Ansari-Lari, J. L. Hicks, N. E. Davidson and W. G. Nelson (2005). "Increased protein stability causes DNA methyltransferase 1 dysregulation in breast cancer." *The Journal of biological chemistry* **280**(18): 18302-18310.
- Akbarian, S., M. S. Beeri and V. Haroutunian (2013). "Epigenetic Determinants of Healthy and Diseased Brain Aging and Cognition." *JAMA Neurology*.
- Akhtar, R. S., J. M. Ness and K. A. Roth (2004). "Bcl-2 family regulation of neuronal development and neurodegeneration." *Bba-Mol Cell Res* **1644**(2-3): 189-203.
- Alcantara, S., E. Pozas, C. F. Ibanez and E. Soriano (2006). "BDNF-modulated spatial organization of Cajal-Retzius and GABAergic neurons in the marginal zone plays a role in the development of cortical organization." *Cereb Cortex* **16**(4): 487-499.
- Alifragis, P., A. Liapi and J. G. Parnavelas (2004). "Lhx6 regulates the migration of cortical interneurons from the ventral telencephalon but does not specify their GABA phenotype." *Journal of Neuroscience* **24**(24): 5643-5648.
- Allsopp, T. E., S. Wyatt, H. F. Paterson and A. M. Davies (1993). "The proto-oncogene bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis." *Cell* **73**(2): 295-307.
- Andersen, S. S. and G. Q. Bi (2000). "Axon formation: a molecular model for the generation of neuronal polarity." *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **22**(2): 172-179.
- Anderson, S. A., D. D. Eisenstat, L. Shi and J. L. Rubenstein (1997). "Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes." *Science* **278**(5337): 474-476.
- Anderson, S. A., O. Marin, C. Horn, K. Jennings and J. L. Rubenstein (2001). "Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences." *Development* **128**(3): 353-363.
- Ang, E. S., Jr., T. F. Haydar, V. Gluncic and P. Rakic (2003). "Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse



- cortex." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**(13): 5805-5815.
- Antypa, M., C. Faux, G. Eichele, J. G. Parnavelas and W. D. Andrews (2011). "Differential gene expression in migratory streams of cortical interneurons." *The European journal of neuroscience* **34**(10): 1584-1594.
- Arakawa, H. (2004). "Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis." *Nature reviews. Cancer* **4**(12): 978-987.
- Arzenani, M. K., A. E. Zade, Y. Ming, S. J. Vijverberg, Z. Zhang, Z. Khan, S. Sadique, L. Kallenbach, L. Hu, V. Vukojevic and T. J. Ekstrom (2011). "Genomic DNA hypomethylation by histone deacetylase inhibition implicates DNMT1 nuclear dynamics." *Molecular and cellular biology* **31**(19): 4119-4128.
- Asgatay, S., C. Champion, G. Marloie, T. Drujon, C. Senamaud-Beaufort, A. Ceccaldi, A. Erdmann, A. Rajavelu, P. Schambel, A. Jeltsch, O. Lequin, P. Karoyan, P. B. Arimondo and D. Guianvarc'h (2014). "Synthesis and evaluation of analogues of N-phthaloyl-L-tryptophan (RG108) as inhibitors of DNA methyltransferase 1." *Journal of medicinal chemistry* **57**(2): 421-434.
- Avila, A., P. M. Vidal, T. N. Dear, R. J. Harvey, J. M. Rigo and L. Nguyen (2013). "Glycine receptor alpha2 subunit activation promotes cortical interneuron migration." *Cell reports* **4**(4): 738-750.
- Avraham, O., Y. Hadas, L. Vald, S. Zisman, A. Schejter, A. Visel and A. Klar (2009). "Transcriptional control of axonal guidance and sorting in dorsal interneurons by the Lim-HD proteins Lhx9 and Lhx1." *Neural development* **4**: 21.
- Azim, E., D. Jabaudon, R. M. Fame and J. D. Macklis (2009). "SOX6 controls dorsal progenitor identity and interneuron diversity during neocortical development." *Nature neuroscience* **12**(10): 1238-1247.
- Baets, J., X. Duan, Y. Wu, G. Smith, W. W. Seeley, I. Mademan, N. M. McGrath, N. C. Beadell, J. Khoury, M. V. Botuyan, G. Mer, G. A. Worrell, K. Hojo, J. DeLeon, M. Laura, Y. T. Liu, J. Senderek, J. Weis, P. Van den Bergh, S. L. Merrill, M. M. Reilly, H. Houlden, M. Grossman, S. S. Scherer, P. De Jonghe, P. J. Dyck and C. J. Klein (2015). "Defects of mutant DNMT1 are linked to a spectrum of neurological disorders." *Brain : a journal of neurology* **138**(Pt 4): 845-861.
- Bandler, R. C., C. Mayer and G. Fishell (2017). "Cortical interneuron specification: the juncture of genes, time and geometry." *Current opinion in neurobiology* **42**: 17-24.

- Banerjee-Basu, S. and A. D. Baxeavanis (2001). "Molecular evolution of the homeodomain family of transcription factors." *Nucleic acids research* **29**(15): 3258-3269.
- Barnes, J. D., J. L. Crosby, C. M. Jones, C. V. Wright and B. L. Hogan (1994). "Embryonic expression of Lim-1, the mouse homolog of *Xenopus* Xlim-1, suggests a role in lateral mesoderm differentiation and neurogenesis." *Developmental biology* **161**(1): 168-178.
- Barski, A., S. Cuddapah, K. Cui, T. Y. Roh, D. E. Schones, Z. Wang, G. Wei, I. Chepelev and K. Zhao (2007). "High-resolution profiling of histone methylations in the human genome." *Cell* **129**(4): 823-837.
- Bartolini, G., G. Ciceri and O. Marin (2013). "Integration of GABAergic interneurons into cortical cell assemblies: lessons from embryos and adults." *Neuron* **79**(5): 849-864.
- Bashtrykov, P., G. Jankevicius, A. Smarandache, R. Z. Jurkowska, S. Ragozin and A. Jeltsch (2012). "Specificity of Dnmt1 for methylation of hemimethylated CpG sites resides in its catalytic domain." *Chemistry & biology* **19**(5): 572-578.
- Bashtrykov, P., S. Ragozin and A. Jeltsch (2012). "Mechanistic details of the DNA recognition by the Dnmt1 DNA methyltransferase." *FEBS letters* **586**(13): 1821-1823.
- Batista-Brito, R., E. Rossignol, J. Hjerling-Leffler, M. Denaxa, M. Wegner, V. Lefebvre, V. Pachnis and G. Fishell (2009). "The cell-intrinsic requirement of Sox6 for cortical interneuron development." *Neuron* **63**(4): 466-481.
- Bedont, J. L., T. A. LeGates, E. A. Slat, M. S. Byerly, H. Wang, J. Hu, A. C. Rupp, J. Qian, G. W. Wong, E. D. Herzog, S. Hattar and S. Blackshaw (2014). "Lhx1 controls terminal differentiation and circadian function of the suprachiasmatic nucleus." *Cell reports* **7**(3): 609-622.
- Begum, M. R. and J. C. G. Sng (2017). "Molecular mechanisms of experience-dependent maturation in cortical GABAergic inhibition." *Journal of neurochemistry* **142**(5): 649-661.
- Bellion, A., J. P. Baudoin, C. Alvarez, M. Bornens and C. Metin (2005). "Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**(24): 5691-5699.

- Bernstein, B. E., T. S. Mikkelsen, X. Xie, M. Kamal, D. J. Huebert, J. Cuff, B. Fry, A. Meissner, M. Wernig, K. Plath, R. Jaenisch, A. Wagschal, R. Feil, S. L. Schreiber and E. S. Lander (2006). "A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells." *Cell* **125**(2): 315-326.
- Besson, A., M. Gurian-West, A. Schmidt, A. Hall and J. M. Roberts (2004). "p27(Kip1) modulates cell migration through the regulation of RhoA activation." *Genes & development* **18**(8): 862-876.
- Bortone, D. and F. Polleux (2009). "KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner." *Neuron* **62**(1): 53-71.
- Briscoe, J., L. Sussel, P. Serup, D. Hartigan-O'Connor, T. M. Jessell, J. L. Rubenstein and J. Ericson (1999). "Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling." *Nature* **398**(6728): 622-627.
- Britto, J. M., L. A. Johnston and S. S. Tan (2009). "The stochastic search dynamics of interneuron migration." *Biophysical journal* **97**(3): 699-709.
- Brown, K. N., S. Chen, Z. Han, C. H. Lu, X. Tan, X. J. Zhang, L. Ding, A. Lopez-Cruz, D. Saur, S. A. Anderson, K. Huang and S. H. Shi (2011). "Clonal production and organization of inhibitory interneurons in the neocortex." *Science* **334**(6055): 480-486.
- Brown, M. E. and P. C. Bridgman (2004). "Myosin function in nervous and sensory systems." *Journal of neurobiology* **58**(1): 118-130.
- Brueckner, B., R. Garcia Boy, P. Siedlecki, T. Musch, H. C. Kliem, P. Zielenkiewicz, S. Suhai, M. Wiessler and F. Lyko (2005). "Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases." *Cancer research* **65**(14): 6305-6311.
- Bulchand, S., E. A. Grove, F. D. Porter and S. Tole (2001). "LIM-homeodomain gene Lhx2 regulates the formation of the cortical hem." *Mech Dev* **100**(2): 165-175.
- Buss, R. R., W. Sun and R. W. Oppenheim (2006). "Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development." *Annual review of neuroscience* **29**: 1-35.
- Butler, J. S., L. R. Palam, C. M. Tate, J. R. Sanford, R. C. Wek and D. G. Skalnik (2009). "DNA Methyltransferase protein synthesis is reduced in CXXC finger protein 1-deficient embryonic stem cells." *DNA and cell biology* **28**(5): 223-231.

- Butt, S. J., M. Fuccillo, S. Nery, S. Noctor, A. Kriegstein, J. G. Corbin and G. Fishell (2005). "The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype." *Neuron* **48**(4): 591-604.
- Calmon, M. F., J. Jeschke, W. Zhang, M. Dhir, C. Siebenkas, A. Herrera, H. C. Tsai, H. M. O'Hagan, E. P. Pappou, C. M. Hooker, T. Fu, K. E. Schuebel, E. Gabrielson, P. Rahal, J. G. Herman, S. B. Baylin and N. Ahuja (2015). "Epigenetic silencing of neurofilament genes promotes an aggressive phenotype in breast cancer." *Epigenetics* **10**(7): 622-632.
- Campbell, K. (2005). "Cortical neuron specification: it has its time and place." *Neuron* **46**(3): 373-376.
- Canty, A. J., J. Dietze, M. Harvey, H. Enomoto, J. Milbrandt and C. F. Ibanez (2009). "Regionalized loss of parvalbumin interneurons in the cerebral cortex of mice with deficits in GFRalpha1 signaling." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**(34): 10695-10705.
- Cedar, H. and Y. Bergman (2009). "Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms." *Nature reviews. Genetics* **10**(5): 295-304.
- Chattopadhyaya, B. (2011). "Molecular mechanisms underlying activity-dependent GABAergic synapse development and plasticity and its implications for neurodevelopmental disorders." *Neural plasticity* **2011**: 734231.
- Chattopadhyaya, B. and G. D. Cristo (2012). "GABAergic circuit dysfunctions in neurodevelopmental disorders." *Frontiers in psychiatry* **3**: 51.
- Chedotal, A. and F. M. Rijli (2009). "Transcriptional regulation of tangential neuronal migration in the developing forebrain." *Current opinion in neurobiology* **19**(2): 139-145.
- Chen, J. H., L. Wen, S. Dupuis, J. Y. Wu and Y. Rao (2001). "The N-terminal leucine-rich regions in Slit are sufficient to repel olfactory bulb axons and subventricular zone neurons." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**(5): 1548-1556.
- Chestnut, B. A., Q. Chang, A. Price, C. Lesuisse, M. Wong and L. J. Martin (2011). "Epigenetic regulation of motor neuron cell death through DNA methylation." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**(46): 16619-16636.
- Cholewa-Waclaw, J., A. Bird, M. von Schimmelmann, A. Schaefer, H. Yu, H. Song, R. Madabhushi and L. H. Tsai (2016). "The Role of Epigenetic Mechanisms in the

- Regulation of Gene Expression in the Nervous System." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **36**(45): 11427-11434.
- Chuang, J. C. and P. A. Jones (2007). "Epigenetics and microRNAs." *Pediatric research* **61**(5 Pt 2): 24R-29R.
- Ciceri, G., N. Dehorter, I. Sols, Z. J. Huang, M. Maravall and O. Marin (2013). "Lineage-specific laminar organization of cortical GABAergic interneurons." *Nature neuroscience* **16**(9): 1199-1210.
- Civiero, L., M. D. Cinaru, A. Beilina, U. Rodella, I. Russo, E. Belluzzi, E. Lobbestael, L. Reyniers, G. Hondhamuni, P. A. Lewis, C. Van den Haute, V. Baekelandt, R. Bandopadhyay, L. Bubacco, G. Piccoli, M. R. Cookson, J. M. Taymans and E. Greggio (2015). "Leucine-rich repeat kinase 2 interacts with p21-activated kinase 6 to control neurite complexity in mammalian brain." *Journal of neurochemistry* **135**(6): 1242-1256.
- Clements, E. G., H. P. Mohammad, B. R. Leadem, H. Easwaran, Y. Cai, L. Van Neste and S. B. Baylin (2012). "DNMT1 modulates gene expression without its catalytic activity partially through its interactions with histone-modifying enzymes." *Nucleic acids research* **40**(10): 4334-4346.
- Close, J., H. Xu, N. De Marco Garcia, R. Batista-Brito, E. Rossignol, B. Rudy and G. Fishell (2012). "Satb1 is an activity-modulated transcription factor required for the terminal differentiation and connectivity of medial ganglionic eminence-derived cortical interneurons." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **32**(49): 17690-17705.
- Cobos, I., U. Borello and J. L. Rubenstein (2007). "Dlx transcription factors promote migration through repression of axon and dendrite growth." *Neuron* **54**(6): 873-888.
- Cobos, I., V. Broccoli and J. L. Rubenstein (2005). "The vertebrate ortholog of *Aristaless* is regulated by Dlx genes in the developing forebrain." *The Journal of comparative neurology* **483**(3): 292-303.
- Cobos, I., J. E. Long, M. T. Thwin and J. L. Rubenstein (2006). "Cellular patterns of transcription factor expression in developing cortical Interneurons." *Cerebral Cortex* **16**: 182-188.
- Corbin, J. G. and S. J. Butt (2011). "Developmental mechanisms for the generation of telencephalic interneurons." *Developmental neurobiology* **71**(8): 710-732.

- Costa, M. R. and U. Muller (2014). "Specification of excitatory neurons in the developing cerebral cortex: progenitor diversity and environmental influences." *Frontiers in cellular neuroscience* **8**: 449.
- Crandall, J. E., D. M. McCarthy, K. Y. Araki, J. R. Sims, J. Q. Ren and P. G. Bhide (2007). "Dopamine receptor activation modulates GABA neuron migration from the basal forebrain to the cerebral cortex." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**(14): 3813-3822.
- Dan, I., N. M. Watanabe and A. Kusumi (2001). "The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades." *Trends in cell biology* **11**(5): 220-230.
- Dawid, I. B., J. J. Breen and R. Toyama (1998). "LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions." *Trends in genetics : TIG* **14**(4): 156-162.
- Dawid, I. B. and A. B. Chitnis (2001). "Lim homeobox genes and the CNS: a close relationship." *Neuron* **30**(2): 301-303.
- De Marco Garcia, N. V., T. Karayannis and G. Fishell (2011). "Neuronal activity is required for the development of specific cortical interneuron subtypes." *Nature* **472**(7343): 351-355.
- Deacon, K., P. Mistry, J. Chernoff, J. L. Blank and R. Patel (2003). "p38 Mitogen-activated protein kinase mediates cell death and p21-activated kinase mediates cell survival during chemotherapeutic drug-induced mitotic arrest." *Molecular biology of the cell* **14**(5): 2071-2087.
- Defelipe, J. (2011). "The evolution of the brain, the human nature of cortical circuits, and intellectual creativity." *Frontiers in neuroanatomy* **5**: 29.
- DeFelipe, J., P. L. Lopez-Cruz, R. Benavides-Piccione, C. Bielza, P. Larranaga, S. Anderson, A. Burkhalter, B. Cauli, A. Fairen, D. Feldmeyer, G. Fishell, D. Fitzpatrick, T. F. Freund, G. Gonzalez-Burgos, S. Hestrin, S. Hill, P. R. Hof, J. Huang, E. G. Jones, Y. Kawaguchi, Z. Kisvarday, Y. Kubota, D. A. Lewis, O. Marin, H. Markram, C. J. McBain, H. S. Meyer, H. Monyer, S. B. Nelson, K. Rockland, J. Rossier, J. L. Rubenstein, B. Rudy, M. Scanziani, G. M. Shepherd, C. C. Sherwood, J. F. Staiger, G. Tamas, A. Thomson, Y. Wang, R. Yuste and G. A. Ascoli (2013). "New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons." *Nature reviews. Neuroscience* **14**(3): 202-216.
- Dehorter, N., G. Ciceri, G. Bartolini, L. Lim, I. del Pino and O. Marin (2015). "Tuning of fast-spiking interneuron properties by an activity-dependent transcriptional switch." *Science* **349**(6253): 1216-1220.

- Dekkers, M. P. and Y. A. Barde (2013). "Developmental biology. Programmed cell death in neuronal development." *Science* **340**(6128): 39-41.
- Deleris, P., M. Trost, I. Topisirovic, P. L. Tanguay, K. L. Borden, P. Thibault and S. Meloche (2011). "Activation loop phosphorylation of ERK3/ERK4 by group I p21-activated kinases (PAKs) defines a novel PAK-ERK3/4-MAPK-activated protein kinase 5 signaling pathway." *The Journal of biological chemistry* **286**(8): 6470-6478.
- Denaxa, M., M. Kalaitzidou, A. Garefalaki, A. Achimastou, R. Lasrado, T. Maes and V. Pachnis (2012). "Maturation-promoting activity of SATB1 in MGE-derived cortical interneurons." *Cell reports* **2**(5): 1351-1362.
- Denaxa, M., G. Neves, A. Rabinowitz, S. Kemlo, P. Liodis, J. Burrone and v. Pachnis (2017). "Activity-Dependent Control Of Inhibitory Interneuron Number In The Mammalian Cortex." *BioRxiv Cold Spring Harbor Laboratory* <https://doi.org/10.1101/134916> preprint.
- Dormoy, V., C. Beraud, V. Lindner, L. Thomas, C. Coquard, M. Barthelmebs, D. Jacqmin, H. Lang and T. Massfelder (2011). "LIM-class homeobox gene Lim1, a novel oncogene in human renal cell carcinoma." *Oncogene* **30**(15): 1753-1763.
- Druga, R. (2009). "Neocortical inhibitory system." *Folia biologica* **55**(6): 201-217.
- Du, J., L. M. Johnson, S. E. Jacobsen and D. J. Patel (2015). "DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation." *Nature reviews. Molecular cell biology* **16**(9): 519-532.
- Du, T., Q. Xu, P. J. Ocbina and S. A. Anderson (2008). "NKX2.1 specifies cortical interneuron fate by activating Lhx6." *Development* **135**(8): 1559-1567.
- Dunbar, R. I. and S. Shultz (2007). "Understanding primate brain evolution." *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **362**(1480): 649-658.
- Durkin, C. H., F. Leite, J. V. Cordeiro, Y. Handa, Y. Arakawa, F. Valderrama and M. Way (2017). "RhoD Inhibits RhoC-ROCK-Dependent Cell Contraction via PAK6." *Developmental cell* **41**(3): 315-329 e317.
- Eberharter, A. and P. B. Becker (2002). "Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics." *EMBO reports* **3**(3): 224-229.

- Eden, S., T. Hashimshony, I. Keshet, H. Cedar and A. W. Thorne (1998). "DNA methylation models histone acetylation." *Nature* **394**(6696): 842.
- Eichmann, A., T. Makinen and K. Alitalo (2005). "Neural guidance molecules regulate vascular remodeling and vessel navigation." *Genes & development* **19**(9): 1013-1021.
- Eissenberg, J. C. and A. Shilatifard (2010). "Histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in development and differentiation." *Developmental biology* **339**(2): 240-249.
- Esteve, P. O., H. G. Chin, J. Benner, G. R. Feehery, M. Samaranayake, G. A. Horwitz, S. E. Jacobsen and S. Pradhan (2009). "Regulation of DNMT1 stability through SET7-mediated lysine methylation in mammalian cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(13): 5076-5081.
- Fagiolini, M., C. L. Jensen and F. A. Champagne (2009). "Epigenetic influences on brain development and plasticity." *Current opinion in neurobiology* **19**(2): 207-212.
- Fan, G., C. Beard, R. Z. Chen, G. Csankovszki, Y. Sun, M. Siniaia, D. Biniszkiewicz, B. Bates, P. P. Lee, R. Kuhn, A. Trumpp, C. Poon, C. B. Wilson and R. Jaenisch (2001). "DNA hypomethylation perturbs the function and survival of CNS neurons in postnatal animals." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**(3): 788-797.
- Fan, G., K. Martinowich, M. H. Chin, F. He, S. D. Fouse, L. Hutnick, D. Hattori, W. Ge, Y. Shen, H. Wu, J. ten Hoeve, K. Shuai and Y. E. Sun (2005). "DNA methylation controls the timing of astrogliogenesis through regulation of JAK-STAT signaling." *Development* **132**(15): 3345-3356.
- Farlie, P. G., R. Dringen, S. M. Rees, G. Kannourakis and O. Bernard (1995). "bcl-2 transgene expression can protect neurons against developmental and induced cell death." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(10): 4397-4401.
- Fatemi, M., A. Hermann, S. Pradhan and A. Jeltsch (2001). "The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA." *Journal of molecular biology* **309**(5): 1189-1199.
- Faux, C., S. Rakic, W. Andrews and J. M. Britto (2012). "Neurons on the move: migration and lamination of cortical interneurons." *Neuro-Signals* **20**(3): 168-189.



- Feng, J. and G. Fan (2009). "The role of DNA methylation in the central nervous system and neuropsychiatric disorders." *International review of neurobiology* **89**: 67-84.
- Feng, J., Y. Zhou, S. L. Campbell, T. Le, E. Li, J. D. Sweatt, A. J. Silva and G. Fan (2010). "Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons." *Nature neuroscience* **13**(4): 423-430.
- Fernandez, V., C. Llinares-Benadero and V. Borrell (2016). "Cerebral cortex expansion and folding: what have we learned?" *The EMBO journal* **35**(10): 1021-1044.
- Flames, N. and O. Hobert (2009). "Gene regulatory logic of dopamine neuron differentiation." *Nature* **458**(7240): 885-U887.
- Flames, N., J. E. Long, A. N. Garratt, T. M. Fischer, M. Gassmann, C. Birchmeier, C. Lai, J. L. Rubenstein and O. Marin (2004). "Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1." *Neuron* **44**(2): 251-261.
- Flames, N. and O. Marin (2005). "Developmental mechanisms underlying the generation of cortical interneuron diversity." *Neuron* **46**(3): 377-381.
- Flames, N., R. Pla, D. M. Gelman, J. L. Rubenstein, L. Puelles and O. Marin (2007). "Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial expression of transcriptional codes." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**(36): 9682-9695.
- Flandin, P., Y. Zhao, D. Vogt, J. Jeong, J. Long, G. Potter, H. Westphal and J. L. Rubenstein (2011). "Lhx6 and Lhx8 coordinately induce neuronal expression of Shh that controls the generation of interneuron progenitors." *Neuron* **70**(5): 939-950.
- Frebel, K. and S. Wiese (2006). "Signalling molecules essential for neuronal survival and differentiation." *Biochemical Society transactions* **34**(Pt 6): 1287-1290.
- Friocourt, G., J. S. Liu, M. Antypa, S. Rakic, C. A. Walsh and J. G. Parnavelas (2007). "Both doublecortin and doublecortin-like kinase play a role in cortical interneuron migration." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**(14): 3875-3883.
- Fuks, F. (2005). "DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes." *Current opinion in genetics & development* **15**(5): 490-495.
- Fuks, F., W. A. Burgers, A. Brehm, L. Hughes-Davies and T. Kouzarides (2000). "DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity." *Nature genetics* **24**(1): 88-91.

- Fukunaga, K. and E. Miyamoto (1998). "Role of MAP kinase in neurons." *Mol Neurobiol* **16**(1): 79-95.
- Gehring, W. J., M. Affolter and T. Burglin (1994). "Homeodomain proteins." *Annual review of biochemistry* **63**: 487-526.
- Geiman, T. M. and K. D. Robertson (2002). "Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation-how does it all fit together?" *Journal of cellular biochemistry* **87**(2): 117-125.
- Gelman, D., A. Griveau, N. Dehorter, A. Teissier, C. Varela, R. Pla, A. Pierani and O. Marin (2011). "A wide diversity of cortical GABAergic interneurons derives from the embryonic preoptic area." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**(46): 16570-16580.
- Gelman, D. M. and O. Marin (2010). "Generation of interneuron diversity in the mouse cerebral cortex." *The European journal of neuroscience* **31**(12): 2136-2141.
- Gelman, D. M., O. Marin and J. L. R. Rubenstein (2012). The Generation of Cortical Interneurons. Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. J. L. Noebels, M. Avoli, M. A. Rogawski, R. W. Olsen and A. V. Delgado-Escueta. Bethesda (MD).
- Gelman, D. M., F. J. Martini, S. Nobrega-Pereira, A. Pierani, N. Kessaris and O. Marin (2009). "The embryonic preoptic area is a novel source of cortical GABAergic interneurons." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**(29): 9380-9389.
- Godin, J. D., N. Thomas, S. Laguesse, L. Malinouskaya, P. Close, O. Malaise, A. Purnelle, O. Raineteau, K. Campbell, M. Fero, G. Moonen, B. Malgrange, A. Chariot, C. Metin, A. Besson and L. Nguyen (2012). "p27(KiP1) Is a Microtubule-Associated Protein that Promotes Microtubule Polymerization during Neuron Migration." *Developmental cell* **23**(4): 729-744.
- Golshani, P., L. Hutnick, F. Schweizer and G. Fan (2005). "Conditional Dnmt1 deletion in dorsal forebrain disrupts development of somatosensory barrel cortex and thalamocortical long-term potentiation." *Thalamus & related systems* **3**(3): 227-233.
- Govek, E. E., M. E. Hatten and L. Van Aelst (2011). "The Role of Rho GTPase Proteins in CNS Neuronal Migration." *Developmental neurobiology* **71**(6): 528-553.
- Govindan, S. and D. Jabaudon (2017). "Coupling progenitor and neuronal diversity in the developing neocortex." *FEBS letters*.

- Grayson, D. R. and A. Guidotti (2013). "The dynamics of DNA methylation in schizophrenia and related psychiatric disorders." *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **38**(1): 138-166.
- Gross, A., J. M. McDonnell and S. J. Korsmeyer (1999). "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis." *Genes & development* **13**(15): 1899-1911.
- Guo, J. and E. S. Anton (2014). "Decision making during interneuron migration in the developing cerebral cortex." *Trends in cell biology* **24**(6): 342-351.
- Hacker, G. (2000). "The morphology of apoptosis." *Cell and tissue research* **301**(1): 5-17.
- Halder, R., M. Hennion, R. O. Vidal, O. Shomroni, R. U. Rahman, A. Rajput, T. P. Centeno, F. van Bebber, V. Capece, J. C. Garcia Vizcaino, A. L. Schuetz, S. Burkhardt, E. Benito, M. Navarro Sala, S. B. Javan, C. Haass, B. Schmid, A. Fischer and S. Bonn (2016). "DNA methylation changes in plasticity genes accompany the formation and maintenance of memory." *Nature neuroscience* **19**(1): 102-110.
- Harikumar, A. and E. Meshorer (2015). "Chromatin remodeling and bivalent histone modifications in embryonic stem cells." *EMBO reports* **16**(12): 1609-1619.
- Haring, M., S. Offermann, T. Danker, I. Horst, C. Peterhansel and M. Stam (2007). "Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization." *Plant methods* **3**: 11.
- Harris, K. D. and G. M. Shepherd (2015). "The neocortical circuit: themes and variations." *Nature neuroscience* **18**(2): 170-181.
- Harwell, C. C., L. C. Fuentealba, A. Gonzalez-Cerrillo, P. R. Parker, C. C. Gertz, E. Mazzola, M. T. Garcia, A. Alvarez-Buylla, C. L. Cepko and A. R. Kriegstein (2015). "Wide Dispersion and Diversity of Clonally Related Inhibitory Interneurons." *Neuron* **87**(5): 999-1007.
- Hashimshony, T., J. Zhang, I. Keshet, M. Bustin and H. Cedar (2003). "The role of DNA methylation in setting up chromatin structure during development." *Nature genetics* **34**(2): 187-192.
- Heasman, S. J. and A. J. Ridley (2008). "Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies." *Nat Rev Mol Cell Bio* **9**(9): 690-701.

- Heerboth, S., K. Lapinska, N. Snyder, M. Leary, S. Rollinson and S. Sarkar (2014). "Use of epigenetic drugs in disease: an overview." *Genetics & epigenetics* **6**: 9-19.
- Hermann, A., R. Goyal and A. Jeltsch (2004). "The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites." *The Journal of biological chemistry* **279**(46): 48350-48359.
- Hernandez-Miranda, L. R., J. G. Parnavelas and F. Chiara (2010). "Molecules and mechanisms involved in the generation and migration of cortical interneurons." *ASN neuro* **2**(2): e00031.
- Heyes, C. (2012). "New thinking: the evolution of human cognition." *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **367**(1599): 2091-2096.
- Higashi, S., S. Biskup, A. B. West, D. Trinkaus, V. L. Dawson, R. L. Faull, H. J. Waldvogel, H. Arai, T. M. Dawson, D. J. Moore and P. C. Emson (2007). "Localization of Parkinson's disease-associated LRRK2 in normal and pathological human brain." *Brain research* **1155**: 208-219.
- Hirasawa, R., H. Chiba, M. Kaneda, S. Tajima, E. Li, R. Jaenisch and H. Sasaki (2008). "Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development." *Genes & development* **22**(12): 1607-1616.
- Hobert, O. and H. Westphal (2000). "Functions of LIM-homeobox genes." *Trends in Genetics* **16**(2): 75-83.
- Hu, H. (1999). "Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain." *Neuron* **23**(4): 703-711.
- Huang, C. C., G. D. Orvis, K. M. Kwan and R. R. Behringer (2014). "Lhx1 is required in Mullerian duct epithelium for uterine development." *Developmental biology* **389**(2): 124-136.
- Huang, Z. J. (2009). "Activity-dependent development of inhibitory synapses and innervation pattern: role of GABA signalling and beyond." *The Journal of physiology* **587**(Pt 9): 1881-1888.
- Huang, Z. J., G. Di Cristo and F. Ango (2007). "Development of GABA innervation in the cerebral and cerebellar cortices." *Nature reviews. Neuroscience* **8**(9): 673-686.

- Hughes, T., F. Ture-Ozdemir, F. Alibaz-Oner, P. Coit, H. Direskeneli and A. H. Sawalha (2014). "Epigenome-wide scan identifies a treatment-responsive pattern of altered DNA methylation among cytoskeletal remodeling genes in monocytes and CD4<sup>+</sup> T cells from patients with Behcet's disease." *Arthritis & rheumatology* **66**(6): 1648-1658.
- Hukriede, N. A., T. E. Tsang, R. Habas, P. L. Khoo, K. Steiner, D. L. Weeks, P. P. Tam and I. B. Dawid (2003). "Conserved requirement of Lim1 function for cell movements during gastrulation." *Developmental cell* **4**(1): 83-94.
- Hutnick, L. K., P. Golshani, M. Namihira, Z. Xue, A. Matynia, X. W. Yang, A. J. Silva, F. E. Schweizer and G. Fan (2009). "DNA hypomethylation restricted to the murine forebrain induces cortical degeneration and impairs postnatal neuronal maturation." *Human molecular genetics* **18**(15): 2875-2888.
- Inoue, J., Y. Ueda, T. Bando, T. Mito, S. Noji and H. Ohuchi (2013). "The expression of LIM-homeobox genes, Lhx1 and Lhx5, in the forebrain is essential for neural retina differentiation." *Development, growth & differentiation* **55**(7): 668-675.
- Jackson-Grusby, L., C. Beard, R. Possemato, M. Tudor, D. Fambrough, G. Csankovszki, J. Dausman, P. Lee, C. Wilson, E. Lander and R. Jaenisch (2001). "Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation." *Nature genetics* **27**(1): 31-39.
- Jang, H. S., W. J. Shin, J. E. Lee and J. T. Do (2017). "CpG and Non-CpG Methylation in Epigenetic Gene Regulation and Brain Function." *Genes* **8**(6).
- Ji, Q., H. Hu, F. Yang, J. Yuan, Y. Yang, L. Jiang, Y. Qian, B. Jiang, Y. Zou, Y. Wang, C. Shao and Y. Gong (2014). "CRL4B interacts with and coordinates the SIN3A-HDAC complex to repress CDKN1A and drive cell cycle progression." *Journal of cell science* **127**(Pt 21): 4679-4691.
- Jiang, H., X. Lu, M. Shimada, Y. Dou, Z. Tang and R. G. Roeder (2013). "Regulation of transcription by the MLL2 complex and MLL complex-associated AKAP95." *Nature structural & molecular biology* **20**(10): 1156-1163.
- Jiang, X., S. Shen, C. R. Cadwell, P. Berens, F. Sinz, A. S. Ecker, S. Patel and A. S. Tolias (2015). "Principles of connectivity among morphologically defined cell types in adult neocortex." *Science* **350**(6264): aac9462.
- Jin, B., Y. Li and K. D. Robertson (2011). "DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy?" *Genes & cancer* **2**(6): 607-617.

- Johnson, A. A., K. Akman, S. R. Calimport, D. Wuttke, A. Stolzing and J. P. de Magalhaes (2012). "The role of DNA methylation in aging, rejuvenation, and age-related disease." *Rejuvenation research* **15**(5): 483-494.
- Jones, P. L., G. J. Veenstra, P. A. Wade, D. Vermaak, S. U. Kass, N. Landsberger, J. Strouboulis and A. P. Wolffe (1998). "Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription." *Nature genetics* **19**(2): 187-191.
- Jung, M. and G. P. Pfeifer (2015). "Aging and DNA methylation." *BMC biology* **13**: 7.
- Kaas, J. H. (1987). "The organization of neocortex in mammals: implications for theories of brain function." *Annual review of psychology* **38**: 129-151.
- Kablar, B. (2002). "Different regulatory elements within the MyoD promoter control its expression in the brain and inhibit its functional consequences in neurogenesis." *Tissue & cell* **34**(3): 164-169.
- Kadriu, B., A. Guidotti, Y. Chen and D. R. Grayson (2012). "DNA methyltransferases1 (DNMT1) and 3a (DNMT3a) colocalize with GAD67-positive neurons in the GAD67-GFP mouse brain." *The Journal of comparative neurology* **520**(9): 1951-1964.
- Kania, A. and T. M. Jessell (2003). "Topographic motor projections in the limb imposed by LIM homeodomain protein regulation of ephrin-A:EphA interactions." *Neuron* **38**(4): 581-596.
- Kania, A. and R. Klein (2016). "Mechanisms of ephrin-Eph signalling in development, physiology and disease." *Nature reviews. Molecular cell biology* **17**(4): 240-256.
- Kawaue, T., M. Okamoto, A. Matsuyo, J. Inoue, Y. Ueda, S. Tomonari, S. Noji and H. Ohuchi (2012). "Lhx1 in the proximal region of the optic vesicle permits neural retina development in the chicken." *Biology open* **1**(11): 1083-1093.
- Kelsom, C. and W. Lu (2013). "Development and specification of GABAergic cortical interneurons." *Cell & bioscience* **3**(1): 19.
- Kepecs, A. and G. Fishell (2014). "Interneuron cell types are fit to function." *Nature* **505**(7483): 318-326.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *British journal of cancer* **26**(4): 239-257.

- Kessaris, N., L. Magno, A. N. Rubin and M. G. Oliveira (2014). "Genetic programs controlling cortical interneuron fate." *Current opinion in neurobiology* **26**: 79-87.
- Kim, J. K., M. Samaranayake and S. Pradhan (2009). "Epigenetic mechanisms in mammals." *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **66**(4): 596-612.
- Kriegstein, A. and A. Alvarez-Buylla (2009). "The glial nature of embryonic and adult neural stem cells." *Annual review of neuroscience* **32**: 149-184.
- Kristiansen, M. and J. Ham (2014). "Programmed cell death during neuronal development: the sympathetic neuron model." *Cell death and differentiation* **21**(7): 1025-1035.
- Kumamoto, T. and C. Hanashima (2014). "Neuronal subtype specification in establishing mammalian neocortical circuits." *Neuroscience research* **86**: 37-49.
- Kumar, R., R. Sanawar, X. Li and F. Li (2017). "Structure, biochemistry, and biology of PAK kinases." *Gene* **605**: 20-31.
- Kuroda, S., C. Tokunaga, Y. Kiyohara, O. Higuchi, H. Konishi, K. Mizuno, G. N. Gill and U. Kikkawa (1996). "Protein-protein interaction of zinc finger LIM domains with protein kinase C." *The Journal of biological chemistry* **271**(49): 31029-31032.
- Kwan, K. M. and R. R. Behringer (2002). "Conditional inactivation of Lim1 function." *Genesis* **32**(2): 118-120.
- Laclef, C. and C. Metin (2017). "Conserved rules in embryonic development of cortical interneurons." *Seminars in cell & developmental biology*.
- Lande-Diner, L., J. Zhang, I. Ben-Porath, N. Amariglio, I. Keshet, M. Hecht, V. Azuara, A. G. Fisher, G. Rechavi and H. Cedar (2007). "Role of DNA methylation in stable gene repression." *The Journal of biological chemistry* **282**(16): 12194-12200.
- Larrieu-Lahargue, F., K. R. Thomas and D. Y. Li (2012). "Netrin ligands and receptors: lessons from neurons to the endothelium." *Trends in cardiovascular medicine* **22**(2): 44-47.
- Lee, S. R., S. M. Ramos, A. Ko, D. Masiello, K. D. Swanson, M. L. Lu and S. P. Balk (2002). "AR and ER interaction with a p21-activated kinase (PAK6)." *Molecular endocrinology* **16**(1): 85-99.
- Lefevre, G., N. Babchia, A. Calipel, F. Mouriaux, A. M. Faussat, S. Mrzyk and F. Mascarelli (2009). "Activation of the FGF2/FGFR1 autocrine loop for cell

- proliferation and survival in uveal melanoma cells." *Investigative ophthalmology & visual science* **50**(3): 1047-1057.
- Lein, E. S., T. G. Belgard, M. Hawrylycz and Z. Molnar (2017). "Transcriptomic Perspectives on Neocortical Structure, Development, Evolution, and Disease." *Annual review of neuroscience* **40**: 629-652.
- Leonardo, E. D., L. Hinck, M. Masu, K. KeinoMasu, S. L. Ackerman and M. TessierLavigne (1997). "Vertebrate homologues of C-elegans UNC-5 are candidate netrin receptors." *Nature* **386**(6627): 833-838.
- Levitt, P., K. L. Eagleson and E. M. Powell (2004). "Regulation of neocortical interneuron development and the implications for neurodevelopmental disorders." *Trends in neurosciences* **27**(7): 400-406.
- Lewis, D. A., T. Hashimoto and D. W. Volk (2005). "Cortical inhibitory neurons and schizophrenia." *Nature reviews. Neuroscience* **6**(4): 312-324.
- Li, E., T. H. Bestor and R. Jaenisch (1992). "Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality." *Cell* **69**(6): 915-926.
- Li, G., H. Adesnik, J. Li, J. Long, R. A. Nicoll, J. L. Rubenstein and S. J. Pleasure (2008). "Regional distribution of cortical interneurons and development of inhibitory tone are regulated by Cxcl12/Cxcr4 signaling." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**(5): 1085-1098.
- Lienhard, M., C. Grimm, M. Morkel, R. Herwig and L. Chavez (2014). "MEDIPS: genome-wide differential coverage analysis of sequencing data derived from DNA enrichment experiments." *Bioinformatics* **30**(2): 284-286.
- Liodis, P., M. Denaxa, M. Grigoriou, C. Akufo-Addo, Y. Yanagawa and V. Pachnis (2007). "Lhx6 activity is required for the normal migration and specification of cortical interneuron subtypes." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**(12): 3078-3089.
- Lisabeth, E. M., G. Falivelli and E. B. Pasquale (2013). "Eph receptor signaling and ephrins." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**(9).
- Lister, R., E. A. Mukamel, J. R. Nery, M. Urich, C. A. Puddifoot, N. D. Johnson, J. Lucero, Y. Huang, A. J. Dwork, M. D. Schultz, M. Yu, J. Tonti-Filippini, H. Heyn, S. Hu, J. C. Wu, A. Rao, M. Esteller, C. He, F. G. Haghighi, T. J. Sejnowski, M. M. Behrens and J. R. Ecker (2013). "Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development." *Science* **341**(6146): 1237905.



- Liu, L., T. van Groen, I. Kadish, Y. Li, D. Wang, S. R. James, A. R. Karpf and T. O. Tollefsbol (2011). "Insufficient DNA methylation affects healthy aging and promotes age-related health problems." *Clinical epigenetics* **2**(2): 349-360.
- Liu, W., Y. Liu, H. Liu, W. Zhang, Q. Fu, J. Xu and J. Gu (2015). "Tumor Suppressive Function of p21-activated Kinase 6 in Hepatocellular Carcinoma." *The Journal of biological chemistry* **290**(47): 28489-28501.
- Liu, W. B., X. Jiang, F. Han, Y. H. Li, H. Q. Chen, Y. Liu, J. Cao and J. Y. Liu (2013). "LHX6 acts as a novel potential tumour suppressor with epigenetic inactivation in lung cancer." *Cell death & disease* **4**: e882.
- Liu, X., J. Busby, C. John, J. Wei, X. Yuan and M. L. Lu (2013). "Direct interaction between AR and PAK6 in androgen-stimulated PAK6 activation." *PloS one* **8**(10): e77367.
- Liu, X., C. Wang, W. Liu, J. Li, C. Li, X. Kou, J. Chen, Y. Zhao, H. Gao, H. Wang, Y. Zhang, Y. Gao and S. Gao (2016). "Distinct features of H3K4me3 and H3K27me3 chromatin domains in pre-implantation embryos." *Nature* **537**(7621): 558-562.
- Llambi, F., F. Causeret, E. Bloch-Gallego and P. Mehlen (2001). "Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC." *The EMBO journal* **20**(11): 2715-2722.
- Lodato, S., C. Rouaux, K. B. Quast, C. Jantrachotechatchawan, M. Studer, T. K. Hensch and P. Arlotta (2011). "Excitatory projection neuron subtypes control the distribution of local inhibitory interneurons in the cerebral cortex." *Neuron* **69**(4): 763-779.
- Long, J. E., I. Cobos, G. B. Potter and J. L. Rubenstein (2009). "Dlx1&2 and Mash1 transcription factors control MGE and CGE patterning and differentiation through parallel and overlapping pathways." *Cereb Cortex* **19 Suppl 1**: i96-106.
- Lopez-Bendito, G., R. Lujan, R. Shigemoto, P. Ganter, O. Paulsen and Z. Molnar (2003). "Blockade of GABA(B) receptors alters the tangential migration of cortical neurons." *Cereb Cortex* **13**(9): 932-942.
- Lui, J. H., D. V. Hansen and A. R. Kriegstein (2011). "Development and evolution of the human neocortex." *Cell* **146**(1): 18-36.
- Lysko, D. E., M. Putt and J. A. Golden (2011). "SDF1 regulates leading process branching and speed of migrating interneurons." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**(5): 1739-1745.

- Madisen, L., T. A. Zwingman, S. M. Sunkin, S. W. Oh, H. A. Zariwala, H. Gu, L. L. Ng, R. D. Palmiter, M. J. Hawrylycz, A. R. Jones, E. S. Lein and H. Zeng (2010). "A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain." *Nature neuroscience* **13**(1): 133-140.
- Maekawa, M., T. Ishizaki, S. Boku, N. Watanabe, A. Fujita, A. Iwamatsu, T. Obinata, K. Ohashi, K. Mizuno and S. Narumiya (1999). "Signaling from rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase." *Science* **285**(5429): 895-898.
- Mah, S. P., L. T. Zhong, Y. Liu, A. Roghani, R. H. Edwards and D. E. Bredesen (1993). "The protooncogene bcl-2 inhibits apoptosis in PC12 cells." *Journal of neurochemistry* **60**(3): 1183-1186.
- Mallo, M., D. M. Wellik and J. Deschamps (2010). "Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan." *Developmental biology* **344**(1): 7-15.
- Mao, Z., A. Bonni, F. Xia, M. Nadal-Vicens and M. E. Greenberg (1999). "Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2." *Science* **286**(5440): 785-790.
- Margueron, R. and D. Reinberg (2011). "The Polycomb complex PRC2 and its mark in life." *Nature* **469**(7330): 343-349.
- Marin, O. (2012). "Interneuron dysfunction in psychiatric disorders." *Nature reviews. Neuroscience* **13**(2): 107-120.
- Marin, O. (2013). "Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of neocortical interneurons." *The European journal of neuroscience* **38**(1): 2019-2029.
- Marin, O., S. A. Anderson and J. L. Rubenstein (2000). "Origin and molecular specification of striatal interneurons." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**(16): 6063-6076.
- Marin, O. and U. Muller (2014). "Lineage origins of GABAergic versus glutamatergic neurons in the neocortex." *Current opinion in neurobiology* **26**: 132-141.
- Marin, O., A. S. Plump, N. Flames, C. Sanchez-Camacho, M. Tessier-Lavigne and J. L. Rubenstein (2003). "Directional guidance of interneuron migration to the cerebral cortex relies on subcortical Slit1/2-independent repulsion and cortical attraction." *Development* **130**(9): 1889-1901.

- Marin, O. and J. L. Rubenstein (2001). "A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon." *Nature reviews. Neuroscience* **2**(11): 780-790.
- Marin, O. and J. L. Rubenstein (2003). "Cell migration in the forebrain." *Annual review of neuroscience* **26**: 441-483.
- Marin, O., M. Valiente, X. Ge and L. H. Tsai (2010). "Guiding neuronal cell migrations." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**(2): a001834.
- Marin, O., A. Yaron, A. Bagri, M. Tessier-Lavigne and J. L. Rubenstein (2001). "Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions." *Science* **293**(5531): 872-875.
- Martini, F. J. and M. Valdeolmillos (2010). "Actomyosin Contraction at the Cell Rear Drives Nuclear Translocation in Migrating Cortical Interneurons." *Journal of Neuroscience* **30**(25): 8660-8670.
- Martini, F. J., M. Valiente, G. Lopez Bendo, G. Szabo, F. Moya, M. Valdeolmillos and O. Marin (2009). "Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during tangential neuronal migration." *Development* **136**(1): 41-50.
- Martinou, J. C., M. Dubois-Dauphin, J. K. Staple, I. Rodriguez, H. Frankowski, M. Missotten, P. Albertini, D. Talabot, S. Catsicas, C. Pietra and et al. (1994). "Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia." *Neuron* **13**(4): 1017-1030.
- Mayer, C., R. C. Bandler and G. Fishell (2016). "Lineage Is a Poor Predictor of Interneuron Positioning within the Forebrain." *Neuron* **92**(1): 45-51.
- Mayer, C., X. H. Jaglin, L. V. Cobbs, R. C. Bandler, C. Streicher, C. L. Cepko, S. Hippenmeyer and G. Fishell (2015). "Clonally Related Forebrain Interneurons Disperse Broadly across Both Functional Areas and Structural Boundaries." *Neuron* **87**(5): 989-998.
- McConnell, S. K. (1991). "The generation of neuronal diversity in the central nervous system." *Annual review of neuroscience* **14**: 269-300.
- McKinsey, G. L., S. Lindtner, B. Trzcinski, A. Visel, L. A. Pennacchio, D. Huylebroeck, Y. Higashi and J. L. Rubenstein (2013). "Dlx1&2-dependent expression of Zfhx1b (Sip1, Zeb2) regulates the fate switch between cortical and striatal interneurons." *Neuron* **77**(1): 83-98.
- Mehlen, P. and F. Llambi (2005). "Role of netrin-1 and netrin-1 dependence receptors in colorectal cancers." *British journal of cancer* **93**(1): 1-6.

- Merot, Y., S. Retaux and J. I. Heng (2009). "Molecular mechanisms of projection neuron production and maturation in the developing cerebral cortex." *Seminars in cell & developmental biology* **20**(6): 726-734.
- Merry, D. E. and S. J. Korsmeyer (1997). "Bcl-2 gene family in the nervous system." *Annual review of neuroscience* **20**: 245-267.
- Merry, D. E., D. J. Veis, W. F. Hickey and S. J. Korsmeyer (1994). "bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS." *Development* **120**(2): 301-311.
- Metin, C., J. P. Baudoin, S. Rakic and J. G. Parnavelas (2006). "Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons." *The European journal of neuroscience* **23**(4): 894-900.
- Michaelidis, T. M., M. Sendtner, J. D. Cooper, M. S. Airaksinen, B. Holtmann, M. Meyer and H. Thoenen (1996). "Inactivation of bcl-2 results in progressive degeneration of motoneurons, sympathetic and sensory neurons during early postnatal development." *Neuron* **17**(1): 75-89.
- Mikkelsen, T. S., M. Ku, D. B. Jaffe, B. Issac, E. Lieberman, G. Giannoukos, P. Alvarez, W. Brockman, T. K. Kim, R. P. Koche, W. Lee, E. Mendenhall, A. O'Donovan, A. Presser, C. Russ, X. Xie, A. Meissner, M. Wernig, R. Jaenisch, C. Nusbaum, E. S. Lander and B. E. Bernstein (2007). "Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells." *Nature* **448**(7153): 553-560.
- Miller, M. W. (1995). "Relationship of the time of origin and death of neurons in rat somatosensory cortex: barrel versus septal cortex and projection versus local circuit neurons." *The Journal of comparative neurology* **355**(1): 6-14.
- Moore, L. D., T. Le and G. Fan (2013). "DNA methylation and its basic function." *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **38**(1): 23-38.
- Moore, S. W., M. Tessier-Lavigne and T. E. Kennedy (2007). "Netrins and their receptors." *Axon Growth and Guidance* **621**: 17-31.
- Morris, N. R., V. P. Efimov and X. Xiang (1998). "Nuclear migration, nucleokinesis and lissencephaly." *Trends in cell biology* **8**(12): 467-470.
- Morrison, R. S. and Y. Kinoshita (2000). "The role of p53 in neuronal cell death." *Cell death and differentiation* **7**(10): 868-879.

- Morrison, R. S., Y. Kinoshita, M. D. Johnson, S. Ghatan, J. T. Ho and G. Garden (2002). "Neuronal survival and cell death signaling pathways." *Molecular and Cellular Biology of Neuroprotection in the Cns* **513**: 41-86.
- Murrell, A., P. J. Hurd and I. C. Wood (2013). "Epigenetic mechanisms in development and disease." *Biochemical Society transactions* **41**(3): 697-699.
- Nadarajah, B., P. Alifragis, R. O. Wong and J. G. Parnavelas (2002). "Ventricle-directed migration in the developing cerebral cortex." *Nature neuroscience* **5**(3): 218-224.
- Nadarajah, B. and J. G. Parnavelas (2002). "Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex." *Nature reviews. Neuroscience* **3**(6): 423-432.
- Nakagawa, T. and Y. Xiong (2011). "Chromatin regulation by CRL4 E3 ubiquitin ligases: CUL4B targets WDR5 ubiquitylation in the nucleus." *Cell cycle* **10**(24): 4197-4198.
- Nan, X., H. H. Ng, C. A. Johnson, C. D. Laherty, B. M. Turner, R. N. Eisenman and A. Bird (1998). "Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex." *Nature* **393**(6683): 386-389.
- Nery, S., G. Fishell and J. G. Corbin (2002). "The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations." *Nature neuroscience* **5**(12): 1279-1287.
- Neves, G., M. M. Shah, P. Liodis, A. Achimastou, M. Denaxa, G. Roalfe, A. Sesay, M. C. Walker and V. Pachnis (2013). "The LIM homeodomain protein Lhx6 regulates maturation of interneurons and network excitability in the mammalian cortex." *Cereb Cortex* **23**(8): 1811-1823.
- Nieto, M., E. S. Monuki, H. Tang, J. Imitola, N. Haubst, S. J. Khoury, J. Cunningham, M. Gotz and C. A. Walsh (2004). "Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and upper layers II-IV of the cerebral cortex." *The Journal of comparative neurology* **479**(2): 168-180.
- Nikouei, K., A. B. Munoz-Manchado and J. Hjerling-Leffler (2016). "BCL11B/CTIP2 is highly expressed in GABAergic interneurons of the mouse somatosensory cortex." *Journal of chemical neuroanatomy* **71**: 1-5.
- Ning, X., Z. Shi, X. Liu, A. Zhang, L. Han, K. Jiang, C. Kang and Q. Zhang (2015). "DNMT1 and EZH2 mediated methylation silences the microRNA-200b/a/429 gene and promotes tumor progression." *Cancer letters* **359**(2): 198-205.

- Nishitoh, H., A. Matsuzawa, K. Tobiume, K. Saegusa, K. Takeda, K. Inoue, S. Hori, A. Kakizuka and H. Ichijo (2002). "ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats." *Genes & development* **16**(11): 1345-1355.
- Nobrega-Pereira, S., N. Kessaris, T. Du, S. Kimura, S. A. Anderson and O. Marin (2008). "Postmitotic Nkx2-1 controls the migration of telencephalic interneurons by direct repression of guidance receptors." *Neuron* **59**(5): 733-745.
- Noctor, S. C., A. C. Flint, T. A. Weissman, R. S. Dammerman and A. R. Kriegstein (2001). "Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex." *Nature* **409**(6821): 714-720.
- Noguchi, H., A. Kimura, N. Murao, T. Matsuda, M. Namihira and K. Nakashima (2015). "Expression of DNMT1 in neural stem/precursor cells is critical for survival of newly generated neurons in the adult hippocampus." *Neuroscience research* **95**: 1-11.
- O'Leary, D. D. and S. E. Koester (1993). "Development of projection neuron types, axon pathways, and patterned connections of the mammalian cortex." *Neuron* **10**(6): 991-1006.
- Okano, M., D. W. Bell, D. A. Haber and E. Li (1999). "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development." *Cell* **99**(3): 247-257.
- Oswald, M. J., D. N. Palmer, G. W. Kay, K. J. Barwell and J. D. Cooper (2008). "Location and connectivity determine GABAergic interneuron survival in the brains of South Hampshire sheep with CLN6 neuronal ceroid lipofuscinosis." *Neurobiology of disease* **32**(1): 50-65.
- Otaki, J. M., M. Hatano, R. Matayoshi, T. Tokuhisa and H. Yamamoto (2010). "The proto-oncogene BCL6 promotes survival of olfactory sensory neurons." *Developmental neurobiology* **70**(6): 424-435.
- Palmesino, E., D. L. Rousso, T. J. Kao, A. Klar, E. Laufer, O. Uemura, H. Okamoto, B. G. Novitsch and A. Kania (2010). "Foxp1 and Ihx1 coordinate motor neuron migration with axon trajectory choice by gating Reelin signalling." *PLoS biology* **8**(8): e1000446.
- Peng, D., I. Kryczek, N. Nagarsheth, L. Zhao, S. Wei, W. Wang, Y. Sun, E. Zhao, L. Vatan, W. Szeliga, J. Kotarski, R. Tarkowski, Y. Dou, K. Cho, S. Hensley-Alford, A. Munkarah, R. Liu and W. Zou (2015). "Epigenetic silencing of TH1-type

- chemokines shapes tumour immunity and immunotherapy." *Nature* **527**(7577): 249-253.
- Pensold, D., J. Symmank, A. Hahn, T. Lingner, G. Salinas-Riester, B. R. Downie, F. Ludwig, A. Rotzsch, N. Haag, N. Andreas, K. Schubert, C. A. Hübner, T. Pieler and G. Zimmer (2016). "The DNA methyltransferase 1 (DNMT1) control the shape and dynamics of migrating POA-derived interneurons fated for the murine cerebral cortex." *Cerebral Cortex*.
- Peyre, E., C. G. Silva and L. Nguyen (2015). "Crosstalk between intracellular and extracellular signals regulating interneuron production, migration and integration into the cortex." *Frontiers in cellular neuroscience* **9**: 129.
- Pfisterer, U. and K. Khodosevich (2017). "Neuronal survival in the brain: neuron type-specific mechanisms." *Cell death & disease* **8**(3): e2643.
- Philippidou, P. and J. S. Dasen (2013). "Hox genes: choreographers in neural development, architects of circuit organization." *Neuron* **80**(1): 12-34.
- Pillai, A., A. Mansouri, R. Behringer, H. Westphal and M. Goulding (2007). "Lhx1 and Lhx5 maintain the inhibitory-neurotransmitter status of interneurons in the dorsal spinal cord." *Development* **134**(2): 357-366.
- Pla, R., V. Borrell, N. Flames and O. Marin (2006). "Layer acquisition by cortical GABAergic interneurons is independent of Reelin signaling." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**(26): 6924-6934.
- Polleux, F., K. L. Whitford, P. A. Dijkhuizen, T. Vitalis and A. Ghosh (2002). "Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling." *Development* **129**(13): 3147-3160.
- Porter, F. D., J. Drago, Y. Xu, S. S. Cheema, C. Wassif, S. P. Huang, E. Lee, A. Grinberg, J. S. Massalas, D. Bodine, F. Alt and H. Westphal (1997). "Lhx2, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development." *Development* **124**(15): 2935-2944.
- Portt, L., G. Norman, C. Clapp, M. Greenwood and M. T. Greenwood (2011). "Anti-apoptosis and cell survival: a review." *Biochimica et biophysica acta* **1813**(1): 238-259.
- Powell, E. M., W. M. Mars and P. Levitt (2001). "Hepatocyte growth factor/scatter factor is a motogen for interneurons migrating from the ventral to dorsal telencephalon." *Neuron* **30**(1): 79-89.

- Pozas, E. and C. F. Ibanez (2005). "GDNF and GFRalpha1 promote differentiation and tangential migration of cortical GABAergic neurons." *Neuron* **45**(5): 701-713.
- Pradhan, S., A. Bacolla, R. D. Wells and R. J. Roberts (1999). "Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation." *Journal of Biological Chemistry* **274**(46): 33002-33010.
- Puelles, L. and J. L. R. Rubenstein (1993). "Expression Patterns of Homeobox and Other Putative Regulatory Genes in the Embryonic Mouse Forebrain Suggest a Neuromeric Organization." *Trends in neurosciences* **16**(11): 472-479.
- Puelles, L. and J. L. R. Rubenstein (2003). "Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model." *Trends in neurosciences* **26**(9): 469-476.
- Purkait, S., V. Sharma, A. Kumar, P. Pathak, S. Mallick, P. Jha, M. C. Sharma, V. Suri, P. K. Julka, A. Suri, B. S. Sharma and C. Sarkar (2016). "Expression of DNA methyltransferases 1 and 3B correlates with EZH2 and this 3-marker epigenetic signature predicts outcome in glioblastomas." *Experimental and molecular pathology* **100**(2): 312-320.
- Rakic, P. (2009). "Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology." *Nature reviews. Neuroscience* **10**(10): 724-735.
- Reddington, J. P., S. M. Perricone, C. E. Nestor, J. Reichmann, N. A. Youngson, M. Suzuki, D. Reinhardt, D. S. Dunican, J. G. Prendergast, H. Mjoseng, B. H. Ramsahoye, E. Whitelaw, J. M. Greally, I. R. Adams, W. A. Bickmore and R. R. Meehan (2013). "Redistribution of H3K27me3 upon DNA hypomethylation results in de-repression of Polycomb target genes." *Genome biology* **14**(3): R25.
- Rhee, K. D., J. Yu, C. Y. Zhao, G. Fan and X. J. Yang (2012). "Dnmt1-dependent DNA methylation is essential for photoreceptor terminal differentiation and retinal neuron survival." *Cell death & disease* **3**: e427.
- Ridley, A. J., M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons and A. R. Horwitz (2003). "Cell migration: integrating signals from front to back." *Science* **302**(5651): 1704-1709.
- Rio, D. C., M. Ares, Jr., G. J. Hannon and T. W. Nilsen (2010). "Ethanol precipitation of RNA and the use of carriers." *Cold Spring Harbor protocols* **2010**(6): pdb prot5440.



- Rossignol, E. (2011). "Genetics and function of neocortical GABAergic interneurons in neurodevelopmental disorders." *Neural plasticity* **2011**: 649325.
- Rubenstein, J. L. (2011). "Annual Research Review: Development of the cerebral cortex: implications for neurodevelopmental disorders." *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines* **52**(4): 339-355.
- Rubenstein, J. L. and M. M. Merzenich (2003). "Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems." *Genes, brain, and behavior* **2**(5): 255-267.
- Rubin, A. N. and N. Kessaris (2013). "PROX1: a lineage tracer for cortical interneurons originating in the lateral/caudal ganglionic eminence and preoptic area." *PloS one* **8**(10): e77339.
- Rudolph, J., K. Gerstmann, G. Zimmer, A. Steinecke, A. Doding and J. Bolz (2014). "A dual role of EphB1/ephrin-B3 reverse signaling on migrating striatal and cortical neurons originating in the preoptic area: should I stay or go away?" *Frontiers in cellular neuroscience* **8**: 185.
- Rudolph, J., G. Zimmer, A. Steinecke, S. Barchmann and J. Bolz (2010). "Ephrins guide migrating cortical interneurons in the basal telencephalon." *Cell adhesion & migration* **4**(3): 400-408.
- Rudy, B., G. Fishell, S. Lee and J. Hjerling-Leffler (2011). "Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons." *Developmental neurobiology* **71**(1): 45-61.
- Rugg-Gunn, P. J., B. J. Cox, A. Ralston and J. Rossant (2010). "Distinct histone modifications in stem cell lines and tissue lineages from the early mouse embryo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(24): 10783-10790.
- Saha, B., P. Hari, D. Huilgol and S. Tole (2007). "Dual role for LIM-homeodomain gene Lhx2 in the formation of the lateral olfactory tract." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**(9): 2290-2297.
- Sanchez-Garcia, I., H. Osada, A. Forster and T. H. Rabbitts (1993). "The cysteine-rich LIM domains inhibit DNA binding by the associated homeodomain in Isl-1." *The EMBO journal* **12**(11): 4243-4250.
- Sanchez-Huertas, C. and B. Rico (2011). "CREB-Dependent Regulation of GAD65 Transcription by BDNF/TrkB in Cortical Interneurons." *Cereb Cortex* **21**(4): 777-788.

- Sato, A. and H. Shibuya (2013). "WNK signaling is involved in neural development via Lhx8/Awh expression." *PloS one* **8**(1): e55301.
- Sawaguchi, T. (1992). "The size of the neocortex in relation to ecology and social structure in monkeys and apes." *Folia primatologica; international journal of primatology* **58**(3): 130-145.
- Schaar, B. T. and S. K. McConnell (2005). "Cytoskeletal coordination during neuronal migration." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(38): 13652-13657.
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak and A. Cardona (2012). "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis." *Nature methods* **9**(7): 676-682.
- Schmandke, A., A. Schmandke and S. M. Strittmatter (2007). "ROCK and Rho: Biochemistry and neuronal functions of rho-associated protein kinases." *Neuroscientist* **13**(5): 454-469.
- Sen, G. L., J. A. Reuter, D. E. Webster, L. Zhu and P. A. Khavari (2010). "DNMT1 maintains progenitor function in self-renewing somatic tissue." *Nature* **463**(7280): 563-567.
- Shawlot, W. and R. R. Behringer (1995). "Requirement for Lim1 in head-organizer function." *Nature* **374**(6521): 425-430.
- Sherwood, C. C., F. Subiaul and T. W. Zawidzki (2008). "A natural history of the human mind: tracing evolutionary changes in brain and cognition." *Journal of anatomy* **212**(4): 426-454.
- Shinozaki, K., T. Miyagi, M. Yoshida, T. Miyata, M. Ogawa, S. Aizawa and Y. Suda (2002). "Absence of Cajal-Retzius cells and subplate neurons associated with defects of tangential cell migration from ganglionic eminence in Emx1/2 double mutant cerebral cortex." *Development* **129**(14): 3479-3492.
- Shirasaki, R. and S. L. Pfaff (2002). "Transcriptional codes and the control of neuronal identity." *Annual review of neuroscience* **25**: 251-281.
- Slack-Davis, J. K., S. T. Eblen, M. Zecevic, S. A. Boerner, A. Tarcsafalvi, H. B. Diaz, M. S. Marshall, M. J. Weber, J. T. Parsons and A. D. Catling (2003). "PAK1 phosphorylation of MEK1 regulates fibronectin-stimulated MAPK activation." *The Journal of cell biology* **162**(2): 281-291.

- Smallwood, A., P. O. Esteve, S. Pradhan and M. Carey (2007). "Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing." *Genes & development* **21**(10): 1169-1178.
- So, A. Y., J. W. Jung, S. Lee, H. S. Kim and K. S. Kang (2011). "DNA methyltransferase controls stem cell aging by regulating BMI1 and EZH2 through microRNAs." *PloS one* **6**(5): e19503.
- Southwell, D. G., M. F. Paredes, R. P. Galvao, D. L. Jones, R. C. Froemke, J. Y. Sebe, C. Alfaro-Cervello, Y. Tang, J. M. Garcia-Verdugo, J. L. Rubenstein, S. C. Baraban and A. Alvarez-Buylla (2012). "Intrinsically determined cell death of developing cortical interneurons." *Nature* **491**(7422): 109-113.
- Stanco, A., C. Szekeres, N. Patel, S. Rao, K. Campbell, J. A. Kreidberg, F. Polleux and E. S. Anton (2009). "Netrin-1-alpha3beta1 integrin interactions regulate the migration of interneurons through the cortical marginal zone." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(18): 7595-7600.
- Stankiewicz, T. R. and D. A. Linseman (2014). "Rho family GTPases: key players in neuronal development, neuronal survival, and neurodegeneration." *Frontiers in cellular neuroscience* **8**: 314.
- Steinecke, A., C. Gampe, F. Nitzsche and J. Bolz (2014). "DISC1 knockdown impairs the tangential migration of cortical interneurons by affecting the actin cytoskeleton." *Frontiers in cellular neuroscience* **8**: 190.
- Steinecke, A., C. Gampe, G. Zimmer, J. Rudolph and J. Bolz (2014). "EphA/ephrin A reverse signaling promotes the migration of cortical interneurons from the medial ganglionic eminence." *Development* **141**(2): 460-471.
- Stumm, R. K., C. Zhou, T. Ara, F. Lazarini, M. Dubois-Dalcq, T. Nagasawa, V. Holtt and S. Schulz (2003). "CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**(12): 5123-5130.
- Sultan, K. T., K. N. Brown and S. H. Shi (2013). "Production and organization of neocortical interneurons." *Frontiers in cellular neuroscience* **7**: 221.
- Sultan, K. T., Z. Han, X. J. Zhang, A. Xianyu, Z. Li, K. Huang and S. H. Shi (2016). "Clonally Related GABAergic Interneurons Do Not Randomly Disperse but Frequently Form Local Clusters in the Forebrain." *Neuron* **92**(1): 31-44.

- Sussel, L., O. Marin, S. Kimura and J. L. Rubenstein (1999). "Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum." *Development* **126**(15): 3359-3370.
- Svedruzic, Z. M. (2011). "Dnmt1 structure and function." *Progress in molecular biology and translational science* **101**: 221-254.
- Symmank, J., Zimmer, G: Regulation of neuronal survival by DNA methyltransferases. Neural Regeneration Research. (accepted 10/2017)
- Szczepanowska, J. (2009). "Involvement of Rac/Cdc42/PAK pathway in cytoskeletal rearrangements." *Acta biochimica Polonica* **56**(2): 225-234.
- Tanaka, S. S., Y. L. Yamaguchi, K. A. Steiner, T. Nakano, R. Nishinakamura, K. M. Kwan, R. R. Behringer and P. P. Tam (2010). "Loss of Lhx1 activity impacts on the localization of primordial germ cells in the mouse." *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **239**(11): 2851-2859.
- Tang, L., E. Nogales and C. Ciferri (2010). "Structure and function of SWI/SNF chromatin remodeling complexes and mechanistic implications for transcription." *Progress in biophysics and molecular biology* **102**(2-3): 122-128.
- Tatti, R., M. S. Haley, O. K. Swanson, T. Tselha and A. Maffei (2017). "Neurophysiology and Regulation of the Balance Between Excitation and Inhibition in Neocortical Circuits." *Biological psychiatry* **81**(10): 821-831.
- Teubner, B. and W. A. Schulz (1995). "Regulation of DNA methyltransferase during differentiation of F9 mouse embryonal carcinoma cells." *Journal of cellular physiology* **165**(2): 284-290.
- Tielens, S., S. Huysseune, J. D. Godin, A. Chariot, B. Malgrange and L. Nguyen (2016). "Elongator controls cortical interneuron migration by regulating actomyosin dynamics." *Cell research* **26**(10): 1131-1148.
- Tiveron, M. C., M. Rossel, B. Moepps, Y. L. Zhang, R. Seidenfaden, J. Favor, N. Konig and H. Cremer (2006). "Molecular interaction between projection neuron precursors and invading interneurons via stromal-derived factor 1 (CXCL12)/CXCR4 signaling in the cortical subventricular zone/intermediate zone." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**(51): 13273-13278.

- Tobiume, K., A. Matsuzawa, T. Takahashi, H. Nishitoh, K. Morita, K. Takeda, O. Minowa, K. Miyazono, T. Noda and H. Ichijo (2001). "ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis." *EMBO reports* **2**(3): 222-228.
- Tomlinson, D. C., F. R. Lamont, S. D. Shnyder and M. A. Knowles (2009). "Fibroblast growth factor receptor 1 promotes proliferation and survival via activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in bladder cancer." *Cancer research* **69**(11): 4613-4620.
- Tremblay, R., S. Lee and B. Rudy (2016). "GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits." *Neuron* **91**(2): 260-292.
- Trowbridge, J. J., J. W. Snow, J. Kim and S. H. Orkin (2009). "DNA methyltransferase 1 is essential for and uniquely regulates hematopoietic stem and progenitor cells." *Cell stem cell* **5**(4): 442-449.
- Tsai, L. H. and J. G. Gleeson (2005). "Nucleokinesis in neuronal migration." *Neuron* **46**(3): 383-388.
- Tsang, T. E., P. L. Khoo, R. V. Jamieson, S. X. Zhou, S. L. Ang, R. Behringer and P. P. Tam (2001). "The allocation and differentiation of mouse primordial germ cells." *The International journal of developmental biology* **45**(3): 549-555.
- Tucker, E. S., F. Polleux and A. S. LaMantia (2006). "Position and time specify the migration of a pioneering population of olfactory bulb interneurons." *Developmental biology* **297**(2): 387-401.
- Tuncdemir, S. N., G. Fishell and R. Batista-Brito (2015). "miRNAs are Essential for the Survival and Maturation of Cortical Interneurons." *Cereb Cortex* **25**(7): 1842-1857.
- Turrero Garcia, M., E. Mazzola and C. C. Harwell (2016). "Lineage Relationships Do Not Drive MGE/PoA-Derived Interneuron Clustering in the Brain." *Neuron* **92**(1): 52-58.
- Tyson, J. A. and S. A. Anderson (2014). "GABAergic interneuron transplants to study development and treat disease." *Trends in neurosciences* **37**(3): 169-177.
- Urduingio, R. G., J. V. Sanchez-Mut and M. Esteller (2009). "Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies." *The Lancet. Neurology* **8**(11): 1056-1072.

- Uribe, E. and R. Wix (2012). "Neuronal migration, apoptosis and bipolar disorder." *Revista de psiquiatria y salud mental* **5**(2): 127-133.
- Vaissiere, T., C. Sawan and Z. Herceg (2008). "Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing." *Mutation research* **659**(1-2): 40-48.
- Valiente, M. and O. Marin (2010). "Neuronal migration mechanisms in development and disease." *Current opinion in neurobiology* **20**(1): 68-78.
- van den Berghe, V., E. Stappers, B. Vandesande, J. Dimidschstein, R. Kroes, A. Francis, A. Conidi, F. Lesage, R. Dries, S. Cazzola, G. Berx, N. Kessar, P. Vanderhaeghen, W. van Ijcken, F. G. Grosveld, S. Goossens, J. J. Haigh, G. Fishell, A. Goffinet, S. Aerts, D. Huylebroeck and E. Seuntjens (2013). "Directed migration of cortical interneurons depends on the cell-autonomous action of Sip1." *Neuron* **77**(1): 70-82.
- Vidal, C., B. Geny, J. Melle, M. Jandrot-Perrus and M. Fontenay-Roupie (2002). "Cdc42/Rac1-dependent activation of the p21-activated kinase (PAK) regulates human platelet lamellipodia spreading: implication of the cortical-actin binding protein cortactin." *Blood* **100**(13): 4462-4469.
- Vire, E., C. Brenner, R. Deplus, L. Blanchon, M. Fraga, C. Didelot, L. Morey, A. Van Eynde, D. Bernard, J. M. Vanderwinden, M. Bollen, M. Esteller, L. Di Croce, Y. de Launoit and F. Fuks (2006). "The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation." *Nature* **439**(7078): 871-874.
- Vitalis, T. and J. Rossier (2011). "New insights into cortical interneurons development and classification: contribution of developmental studies." *Developmental neurobiology* **71**(1): 34-44.
- Vogt, D., R. F. Hunt, S. Mandal, M. Sandberg, S. N. Silberberg, T. Nagasawa, Z. Yang, S. C. Baraban and J. L. Rubenstein (2014). "Lhx6 directly regulates Arx and CXCR7 to determine cortical interneuron fate and laminar position." *Neuron* **82**(2): 350-364.
- Voigt, P., W. W. Tee and D. Reinberg (2013). "A double take on bivalent promoters." *Genes & development* **27**(12): 1318-1338.
- Volk, D. W. and D. A. Lewis (2014). "Early developmental disturbances of cortical inhibitory neurons: contribution to cognitive deficits in schizophrenia." *Schizophrenia bulletin* **40**(5): 952-957.

- Walsh, C. A. and A. M. Goffinet (2000). "Potential mechanisms of mutations that affect neuronal migration in man and mouse." *Current opinion in genetics & development* **10**(3): 270-274.
- Wamsley, B. and G. Fishell (2017). "Genetic and activity-dependent mechanisms underlying interneuron diversity." *Nature reviews. Neuroscience* **18**(5): 299-309.
- Wang, A. H., H. Zare, K. Mousavi, C. Wang, C. E. Moravec, H. I. Sirotkin, K. Ge, G. Gutierrez-Cruz and V. Sartorelli (2013). "The histone chaperone Spt6 coordinates histone H3K27 demethylation and myogenesis." *The EMBO journal* **32**(8): 1075-1086.
- Wang, P., C. Lin, E. R. Smith, H. Guo, B. W. Sanderson, M. Wu, M. Gogol, T. Alexander, C. Seidel, L. M. Wiedemann, K. Ge, R. Krumlauf and A. Shilatifard (2009). "Global analysis of H3K4 methylation defines MLL family member targets and points to a role for MLL1-mediated H3K4 methylation in the regulation of transcriptional initiation by RNA polymerase II." *Molecular and cellular biology* **29**(22): 6074-6085.
- Wang, Y., G. Li, A. Stanco, J. E. Long, D. Crawford, G. B. Potter, S. J. Pleasure, T. Behrens and J. L. Rubenstein (2011). "CXCR4 and CXCR7 have distinct functions in regulating interneuron migration." *Neuron* **69**(1): 61-76.
- Wichterle, H., M. Alvarez-Dolado, L. Erskine and A. Alvarez-Buylla (2003). "Permissive corridor and diffusible gradients direct medial ganglionic eminence cell migration to the neocortex." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(2): 727-732.
- Wichterle, H., J. M. Garcia-Verdugo, D. G. Herrera and A. Alvarez-Buylla (1999). "Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain." *Nature neuroscience* **2**(5): 461-466.
- Wichterle, H., D. H. Turnbull, S. Nery, G. Fishell and A. Alvarez-Buylla (2001). "In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain." *Development* **128**(19): 3759-3771.
- Wilsch-Brauninger, M., M. Florio and W. B. Huttner (2016). "Neocortex expansion in development and evolution - from cell biology to single genes." *Current opinion in neurobiology* **39**: 122-132.
- Wonders, C. P. and S. A. Anderson (2006). "The origin and specification of cortical interneurons." *Nature reviews. Neuroscience* **7**(9): 687-696.

- Wu, J. I. (2012). "Diverse functions of ATP-dependent chromatin remodeling complexes in development and cancer." *Acta biochimica et biophysica Sinica* **44**(1): 54-69.
- Wu, W., K. Wong, J. Chen, Z. Jiang, S. Dupuis, J. Y. Wu and Y. Rao (1999). "Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit." *Nature* **400**(6742): 331-336.
- Yanagida, M., R. Miyoshi, R. Toyokuni, Y. Zhu and F. Murakami (2012). "Dynamics of the leading process, nucleus, and Golgi apparatus of migrating cortical interneurons in living mouse embryos." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**(41): 16737-16742.
- Yang, F., X. Li, M. Sharma, M. Zarnegar, B. Lim and Z. Sun (2001). "Androgen receptor specifically interacts with a novel p21-activated kinase, PAK6." *The Journal of biological chemistry* **276**(18): 15345-15353.
- Yau, J. M., G. C. DeAngelis and D. E. Angelaki (2015). "Dissecting neural circuits for multisensory integration and crossmodal processing." *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **370**(1677): 20140203.
- Yoo, J., S. Choi and J. L. Medina-Franco (2013). "Molecular modeling studies of the novel inhibitors of DNA methyltransferases SGI-1027 and CBC12: implications for the mechanism of inhibition of DNMTs." *PloS one* **8**(4): e62152.
- Young, M. D., T. A. Willson, M. J. Wakefield, E. Trounson, D. J. Hilton, M. E. Blewitt, A. Oshlack and I. J. Majewski (2011). "ChIP-seq analysis reveals distinct H3K27me3 profiles that correlate with transcriptional activity." *Nucleic acids research* **39**(17): 7415-7427.
- Yozu, M., H. Tabata and K. Nakajima (2005). "The caudal migratory stream: a novel migratory stream of interneurons derived from the caudal ganglionic eminence in the developing mouse forebrain." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**(31): 7268-7277.
- Yuan, J., M. Lipinski and A. Degterev (2003). "Diversity in the mechanisms of neuronal cell death." *Neuron* **40**(2): 401-413.
- Zarbalis, K., Y. Choe, J. A. Siegenthaler, L. A. Orosco and S. J. Pleasure (2012). "Meningeal defects alter the tangential migration of cortical interneurons in Foxc1<sup>hith/hith</sup> mice." *Neural development* **7**: 2.
- Zhang, G. and S. Pradhan (2014). "Mammalian epigenetic mechanisms." *IUBMB life* **66**(4): 240-256.



- Zhang, M., M. Siedow, G. Saia and A. Chakravarti (2010). "Inhibition of p21-activated kinase 6 (PAK6) increases radiosensitivity of prostate cancer cells." *The Prostate* **70**(8): 807-816.
- Zhao, W., J. Yang, W. Shi, X. Wu, B. Shao, Q. Wu, J. Chen and L. Ni (2011). "Upregulation of p21-activated Kinase 6 in rat brain cortex after traumatic brain injury." *Journal of molecular histology* **42**(3): 195-203.
- Zhao, Y., P. Flandin, J. E. Long, M. Dela Cuesta, H. Westphal and J. L. R. Rubenstein (2008). "Distinct molecular pathways for development of telencephalic interneuron subtypes revealed through analysis of Lhx6 mutants." *Journal of Comparative Neurology* **510**(1): 79-99.
- Zhao, Y., K. M. Kwan, C. M. Mailloux, W. K. Lee, A. Grinberg, W. Wurst, R. R. Behringer and H. Westphal (2007). "LIM-homeodomain proteins Lhx1 and Lhx5, and their cofactor Ldb1, control Purkinje cell differentiation in the developing cerebellum." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(32): 13182-13186.
- Zhao, Z. S. and E. Manser (2005). "PAK and other Rho-associated kinases - effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation." *Biochem J* **386**: 201-214.
- Zhao, Z. S. and E. Manser (2012). "PAK family kinases: Physiological roles and regulation." *Cellular logistics* **2**(2): 59-68.
- Zheng, Q. and Y. Zhao (2007). "The diverse biofunctions of LIM domain proteins: determined by subcellular localization and protein-protein interaction." *Biology of the cell* **99**(9): 489-502.
- Zhu, Y., H. Li, L. Zhou, J. Y. Wu and Y. Rao (1999). "Cellular and molecular guidance of GABAergic neuronal migration from an extracortical origin to the neocortex." *Neuron* **23**(3): 473-485.
- Zimmer, G., P. Garcez, J. Rudolph, R. Niehage, F. Weth, R. Lent and J. Bolz (2008). "Ephrin-A5 acts as a repulsive cue for migrating cortical interneurons." *The European journal of neuroscience* **28**(1): 62-73.
- Zimmer, G., J. Rudolph, J. Landmann, K. Gerstmann, A. Steinecke, C. Gampe and J. Bolz (2011). "Bidirectional ephrinB3/EphA4 signaling mediates the segregation of medial ganglionic eminence- and preoptic area-derived interneurons in the deep and superficial migratory stream." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**(50): 18364-18380.

Zimmer, G., S. M. Schanuel, S. Burger, F. Weth, A. Steinecke, J. Bolz and R. Lent (2010). "Chondroitin sulfate acts in concert with semaphorin 3A to guide tangential migration of cortical interneurons in the ventral telencephalon." *Cereb Cortex* **20**(10): 2411-2422.

## 8. Anhang

### 8.1. Zusatzmaterial: Tabelle 10

Die Tabelle 10 ist aufgrund der Länge im .xlsx Format als Zusatzmaterial auf dem zugehörigen Datenträger zu finden und wie folgt bezeichnet:

„Tabelle 10 - Dissertation - Judit Symmank“

**Tabelle 10: Differenziell exprimierte Gene zwischen *Dnmt1* Wildtyp und *Dnmt1* Knockout an E16.** FACS-angereicherte Zellen von E16 *Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1* wildtypischen (*Dnmt1* Wildtyp) und *Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1 loxP<sup>2</sup>* Mäusen (*Dnmt1* Knockout) wurden hinsichtlich ihres mittels *Next Generation Sequencing* detektierten RNA-Expressionsprofils miteinander verglichen. Dargestellt sind entsprechende Transkripte mit Ensemble-Identifizierer und Genname. Im Knockout höher detektierte Transkripte sind durch einen negativen logarithmischen Foldchange ( $\log_2\text{FoldChange}$ ) gekennzeichnet. lfcSE gibt den Fehler der Foldchange-Berechnung an. padj gibt den angepassten p-Wert zur Darstellung von Signifikanzen an. E, Entwicklungsstadium.

### 8.2. Zusatzmaterial: Zeitrafferaufnahmen

Als Zusatzmaterial sind Ausschnitte aus Zeitrafferaufnahmen von migrierenden Zellen in organotypischen Hinrschnitten von E16 *Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1* wildtypischen (*Dnmt1* Wildtyp) und *Hmx3-Cre/tdTomato/Dnmt1 loxP<sup>2</sup>* Mäusen (*Dnmt1* Knockout) angehängt. Die Migration der Zellen wurden wie in Abbildung 9 dargestellt und beschrieben über 15 h alle 12 min anhand ihrer tdTomato-Expression aufgezeichnet.

- Film 1: migrierende *Dnmt1* Wildtyp-Zelle 1, Ausschnitt: 6 h, illustriert in Abbildung 9 B und C
- Film 2: migrierende *Dnmt1* Wildtyp-Zelle 2, Ausschnitt: 3,4 h, illustriert in Abbildung 9 D und E
- Film 3: migrierende *Dnmt1* Knockout-Zelle 1, Ausschnitt: 9,2 h, illustriert in Abbildung 9 G und H
- Film 4: migrierende *Dnmt1* Knockout-Zelle 2, Ausschnitt: 4,8 h, illustriert in Abbildung 9 I und J

### 8.3. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: PHASEN DER KORTIKALEN INTERNEURON-ENTWICKLUNG. ....	6
ABBILDUNG 2: DIE INTRINSISCHE DETERMINIERUNG VON VORLÄUFERN. ....	8
ABBILDUNG 3: MIGRATIONSWEGE VON UNREIFEN KORTIKALEN INTERNEURONEN. ....	10
ABBILDUNG 4: DIE TYPISCHE MORPHOLOGIE MIGRIERENDER INTERNEURONE. ....	13
ABBILDUNG 5: EPIGENETISCHE NETZWERKE REGULIEREN DIE GENEXPRESSION. ....	19
ABBILDUNG 6: EINTEILUNG DES EMBRYONALEN KORONALEN HIRNSCHNITTES IN ZONEN. ....	41
ABBILDUNG 7: DIE TANGENTIALE MIGRATION POA-ABSTAMMENDER UNREIFER INTERNEURONE WIRD DURCH DNMT1 BEEINFLUSST. ....	46
ABBILDUNG 8: <i>DNMT1</i> -DEFIZIENTE ZELLEN WEISEN EINE UNTYPISCHE KOMPLEXE MORPHOLOGIE AUF. ....	48
ABBILDUNG 9: DIE MIGRATIONSKAPAZITÄT VON DNMT1-DEFIZIENTEN ZELLEN IST VERRINGERT. ....	49
ABBILDUNG 10: FRÜHZEITIG AUSDIFFERENZIIERTE ZELLEN DES <i>DNMT1</i> KNOCKOUTS ZEIGEN ERHÖHTE STERBERATEN. ....	50
ABBILDUNG 11: <i>PAK6</i> BEWIRKT MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN IN POA-ZELLEN. ....	53
ABBILDUNG 12: DIE REDUKTION DER <i>PAK6</i> EXPRESSION IN POA-ZELLEN ERHÖHT IHR ÜBERLEBEN. ....	54
ABBILDUNG 13: DIE REDUKTION DES <i>PAK6</i> -EXPRESSIONSLEVELS IN <i>DNMT1</i> -DEFIZIENTEN ZELLEN FÜHRT ZU WIEDERHERSTELLUNG TYPISCHER MORPHOLOGISCHER CHARAKTERISTIKA MIGRIERENDER INTERNEURONE. ....	55
ABBILDUNG 14: DIE <i>PAK6</i> EXPRESSION IST DURCH DNMT1-BEDINGTE VERÄNDERUNG DER H3K27- TRIMETHYLIERUNG, UNABHÄNGIG VON DIREKTER GENMETHYLIERUNG, REGULIERT. ....	58
ABBILDUNG 15: DIE EXPRESSION VON <i>LHX1</i> ÜBERLAPPT IM SUBVENTRIKULAREN BEREICH DES POA MIT HMX3. ....	62
ABBILDUNG 16: DNMT1 BEEINFLUSST DIE GENEXPRESSION VON <i>LHX1</i> DURCH VERÄNDERUNGEN VON H3K27ME3. ....	63
ABBILDUNG 17: EMBRYONALE <i>LHX1</i> KNOCKOUT-TIERE ZEIGEN EINE ERHÖHTE ANZAHL VON ZELLEN IM BASALEN TELLENZEPHALON UND IM KORTEKX. ....	65
ABBILDUNG 18: <i>LHX1</i> -DEFIZIENTE ZELLEN HABEN EINE GESTEIGERTE ÜBERLEBENSRATE, POTENTIELL DURCH DIE REGULATION VON APOPTOSE-ASSOZIIERTEN GENEN. ....	66
ABBILDUNG 19: DIE DELETION VON <i>LHX1</i> WÄHREND DER ENTWICKLUNG FÜHRT ZU EINER REDUZIERTEN ZAHLE POA-ABSTAMMENDER ZELLEN IM ADULTEN KORTEKX. ....	69
ABBILDUNG 20: DAS POA UND DAS SEPTUM ADULTER TIERE ZEIGEN EBENSO EINE ERHÖHTE ZELLZAHL IM <i>LHX1</i> KNOCKOUT. ....	70
ABBILDUNG 21: POA-ABSTAMMENDE <i>LHX1</i> -DEFIZIENTE ZELLEN SIND IM ADULTEN KORTEKX VERMEHRT IN VENTRIKELNAHEN SCHICHTEN LOKALISIERT. ....	72
ABBILDUNG 22: EMBRYONALE, <i>LHX1</i> -DEFIZIENTE POA-ZELLEN ZEIGEN EIN VERÄNDERTES TANGENTIALES MIGRATIONSVERHALTEN. ....	73
ABBILDUNG 23: <i>LHX1</i> STEUERT DIE MIGRATION VON POA-ABSTAMMENDEN ZELLEN MÖGLICHERWEISE DURCH REGULATION DER <i>UNC5B</i> REZEPTOREXPRESSION. ....	75
ABBILDUNG 24: DNMT1 FÖRDERT DAS ÜBERLEBEN VON UNREIFEN MIGRIERENDEN INHIBITORISCHEN INTERNEURONEN DES ZEREBRALEN KORTEKX. ....	86

#### **8.4. Tabellenverzeichnis**

TABELLE 1: GENOTYPISIERUNG VON <i>DNMT1</i> <i>LOXP</i> <sup>2</sup> STELLEN..	32
TABELLE 2: GENOTYPISIERUNG VON <i>LHX1</i> <i>LOXP</i> <sup>2</sup> STELLEN.....	32
TABELLE 3: GENOTYPISIERUNG VON <i>TDTomato</i> STELLEN. ....	33
TABELLE 4: GENOTYPISIERUNG VON <i>Cre</i> UND <i>Ano6</i> STELLEN.....	33
TABELLE 5: VERWENDETE PRIMER FÜR DIE QPCR. ....	34
TABELLE 6: EFFEKTIVITÄTEN DER VERWENDETEN SYNTHETISCHEN siRNA'S.....	35
TABELLE 7: VORAMPLIFIKATION DER CHIP-DNA-PROBEN. ....	35
TABELLE 8: PRIMER FÜR DIE QPCR VON CHIP-DNA-PROBEN .....	36
TABELLE 9: QUANTITATIVE PCR ZUR BESTIMMUNG DES DNA GEHALTS NACH CHIP..	36
TABELLE 10: DIFFERENZIELL EXPRIMIERTE GENE ZWISCHEN <i>DNMT1</i> WILDTYP UND <i>DNMT1</i> KNOCKOUT AN E16. ....	XXXVII

### **8.5. Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. Geraldine Zimmer, Dr. Daniel Pensold, Christiane Schmidt, Raghavendra Singaraveli und Vanessa Gölling

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

---

## **8.6. Publikationen und Posterpräsentationen**

**Symmank J**, Bayer C, Schmidt C, Hahn A, Pensold D & Zimmer G (2018) DNMT1 modulates interneuron morphology by regulating Pak6 expression through crosstalk with histone modifications. *Epigenetics*

**Symmank J**, Gölling V, Gerstmann K & Zimmer G (2018) The transcription factor LHX1 regulates the survival and directed migration of POA-derived cortical interneurons. *Cerebral Cortex*

**Symmank J**, Zimmer G (2017) Regulation of neuronal survival by DNA methyltransferases. *Neural Regeneration Research*.

Pensold D\*, **Symmank J\***, Hahn A, Lingner T, Salinas-Riester G, Downie BR, Ludwig F, Rotzsch A, Haag N, Andreas N, Schubert K, Hübner CA, Pieler T und Zimmer G (2016) The DNA Methyltransferase 1 (DNMT1) Controls the Shape and Dynamics of Migrating POA-Derived Interneurons Fated for the Murine Cerebral Cortex. *Cerebral Cortex*. \* **geteilte Erstautorenschaft**

Gerstmann K, Pensold D, **Symmank J**, Khundadze M, Hübner CA, Bolz J und Zimmer G (2014) Thalamic afferents influence cortical progenitors via ephrinA5/EphA4 interactions. *Development*

Khundadze M, Kollmann K, Koch N, Biskup C, Nietzsche S, Zimmer G, Hennings JC, Huebner AK, **Symmank J**, Jahic A, Ilina EI, Karle K, Schöls L, Kessels M, Braulke T, Qualmann B, Kurth I, Beetz C, und Hübner CA (2013) A hereditary spastic paraplegia mouse model reveals an essential role of ZFYVE26 for the endolysosomal system. *PLOS Genetics*

**Symmank J**, Pensold D, Schmidt C, Demontfort J, Lingner T, Pieler T & Zimmer G (2017) The DNA methyltransferase 1 (DNMT1) promotes migration and survival of POA-derived cortical interneurons by non-canonical transcriptional control of Lhx1. *Posterpräsentation. Cortical Development Conference, Chania, Kreta.*

**Symmank J**, Pensold D, Salinas-Riester G, Lingner T, Pommerenke C, Ludwig F, Pieler T, Haag N und Zimmer G (2015) Decoding subpallial neuronal diversity by single cell transcriptomic profiling. *Posterpräsentation. 45. Meeting der Society of Neuroscience, Chicago, U.S.A.*

---

## **8.7. Danksagung**

Nun ist es an der Zeit mich bei all den Menschen zu bedanken, die mich in den letzten Jahren in dieser herausfordernden, aber auch ungemein produktiven Phase meiner akademischen Laufbahn begleitet haben.

An erster Stelle möchte ich Dr. Geraldine Zimmer meinen besonderen Dank aussprechen. Auf Ihrem Ideenreichtum und ihrer Weitsicht basierend, waren die grundlegende Richtung und die erste zielführenden Fragestellungen für die Bearbeitung meines anspruchsvollen Promotionsprojektes schnell gefunden. Ich danke ihr für die anregenden Diskussionen, hilfreichen fachlichen Ratschläge und die stets positive Kritik, welche meine Arbeit voranbrachten und mich motivierten auch über den Tellerrand zu blicken. Ihr Vertrauen und die Freiheiten, die sie mir in der Bearbeitung meines Projektes ermöglichte, möchte ich hier würdigen. Dies habe ich nie als selbstverständlich angesehen.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. A. Baniahmad für seinen Einsatz als Zweitbetreuer und die Begutachtung dieser umfassenden Arbeit bedanken. Seine Fragen und Anmerkungen in zahlreichen Vorstellungen meines Projektes waren hilfreich und veranlassten mich Dinge von unterschiedlichen Blickwinkeln zu betrachten. Herrn Prof. Dr. M.B.E. Rust danke ich für seine Zeit, die er in die Anfertigung des Drittgutachtens investiert.

Mein umfassender Dank geht auch an Prof. Dr. C.A. Hübner und die Möglichkeit meine Promotion an dem von ihm geleiteten Institut durchzuführen. Allen Mitgliedern der AG Funktionelle Genetik I und der AG Neuroepigenetik möchte ich für das überaus angenehme Arbeitsklima und die lustigen gemeinsamen Spieleabende und Unternehmungen danken.

Daniel Pensold begleitete mich während meiner gesamten Promotionszeit als Laborpartner, sei es mit fachlichen Diskussionen oder privaten Plaudereien. Ich danke ihm für die tolle und überaus produktive Zusammenarbeit. Christiane Schmidt möchte ich ebenso meinen Dank für ihre große Einsatzbereitschaft aussprechen, welche sie nicht nur für ihr Projekt aufbrachte, sondern auch in der Zuarbeit für meine Arbeit.



---

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Vanessa Gölling und Raghavendra Singaraveni für die zur Verfügung gestellten Daten.

Den Mitarbeitern der Core Facility CF Flow Cytometry, Katrin Schubert und Maria Locke vom FLI Jena danke ich für die Durchführung der FACS-Anreicherungen. Genauso möchte ich mich für die Zusammenarbeit bei den Mitarbeitern des TAL Göttingen und für die Durchführung der Sequenzierungen und umfangreichen MEDIP-Analysen bedanken.

Abschließend möchte ich noch meinen ganz herzlichen Dank an meine Familie und Freunde aussprechen. Ohne die Unterstützung meiner Eltern und meiner Schwester wären manche komplizierte Zeiten noch turbulenter gewesen. Danke für den Rückhalt und einen heimatlichen Rückzugsort. Meiner zweiten Familie im Reitstall danke ich für die vielen Male der Ablenkung und des Durchatmens bei gemeinsamen Ausritten.

Mein besonderer Dank gilt auch Diane, für die vielen interessanten und tiefgehenden Gespräche und natürlich auch für die tollen und lustigen Abende. Deine Ehrlichkeit und deine Art über Dinge nachzudenken, eröffneten mir viele neue Wege und gaben mir auch in schwierigen Zeit Halt.

Martin, dir danke ich von ganzem Herzen, vor allem für deinen Rückhalt und deine Geduld. Du hast mir den Rücken frei gehalten und mir Mut zugesprochen. Deine selbstlose Unterstützung und deine Gelassenheit in absoluten Stressphasen ließen mir Raum mein Ziel im Auge zu behalten.